
Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels
WST-I-Assay und zur Gentoxizität mittels
Comet-Assay von Portlandkompositzementen
mit unterschiedlichen Zusatzstoffen,
sowie Klinker und Kalksteinmehl
in humanen Lungenzellen

JULIA WEIGEL



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de



**Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels WST-I-Assay
und zur Gentoxizität mittels Comet-Assay von
Portlandkompositzementen mit unterschiedlichen Zusatzstoffen,
sowie Klinker und Kalksteinmehl in humanen Lungenzellen.**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Julia Weigel, geb. Wall
aus Zelinograd

Gießen, 2011

Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Leitung: Prof. Dr. V. Mersch-Sundermann

Fachbereich Medizin

*Aktuell: Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene, Universitätsklinik Freiburg,
Freiburg*

1. Gutachter: Prof. Dr. med. V. Mersch-Sundermann

2. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Schneider

Tag der Disputation: 19.11.2012

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe, die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Inhalte sind unter Angabe der Literatur gekennzeichnet.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Julia Weigel

Inhaltverzeichnis

Erklärung	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Fragestellung.....	10
1.2 Vorstellung der Testsysteme.....	11
1.2.1 WST-I-Essay	11
1.2.2 Erytrosin B-Assay	12
1.2.3 Alkalische Einzelgelelektrophorese (Comet-Assay).....	13
2 Material und Methoden	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Verwendetes Material und Hersteller	16
2.1.2 Lösungen	18
2.1.3 Zellkultur.....	18
2.1.4 Referenzen	20
2.2 Methoden	24
2.2.1 Zellkultivierung	24
2.2.2 Probenaufbereitung.....	25
2.2.3 Durchführung der Experimente	26
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Zytotoxizität von Zementstäuben	34
3.2 Gentoxizität von Zementstäuben.....	40
3.2.1 Gentoxische Effekte der Referenzen.....	40
3.2.1.1 H ₂ O ₂	40
3.2.1.2 DQ12	41
3.2.1.3 TiO ₂	42
3.2.2 Gentoxische Effekte von Zementstäuben.....	42
3.2.2.1 Zement A	43
3.2.2.2 Zement B	44
3.2.2.3 Zement C	45
3.2.2.4 Zement D	46
3.2.2.5 Klinker	47
3.2.2.6 Kalksteinmehl.....	48
3.2.2.7 Zusammenfassende Betrachtung.....	48
4 Diskussion	50
4.1 Referenzen	50

4.1.1 Wirkmechanismus von Quarz.....	50
4.1.2 Wirkmechanismus von TiO ₂	53
4.2.3 Bewertung eigener Ergebnisse	55
4.2 Zemente	57
4.2.1 Bisherige Daten zur Toxizität von Zementen	57
4.2.2 Überlegungen zu gentoxischen Wirkmechanismen von Zement-Staubpartikeln und Inhaltsstoffen	60
4.2.3 Bewertung eigener Ergebnisse	62
5 Zusammenfassung	66
6 Summary	68
7 Literaturverzeichnis.....	69
8 Anhang	80
9 Danksagung.....	83

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abb.</i>	Abbildung
<i>bzw.</i>	Beziehungsweise
<i>CO₂</i>	Kohlenstoffdioxid
<i>COPD</i>	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
<i>d.h.</i>	das heißt
<i>DIN</i>	Deutsches Institut für Normung
<i>DMEM</i>	Dulbecco's minimal essential medium
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>DQ12</i>	Dörentruper Quarz
<i>EDTA</i>	Ethyldiamintetraessigsäure
<i>et. al.</i>	et alii, „und andere“
<i>FCS</i>	Fetales Kälberserum
<i>FEV₁</i>	forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
<i>FVC</i>	forcierte Vitalkapazität
<i>ggf.</i>	gegebenenfalls
<i>g</i>	Gramm
<i>h</i>	Stunde
<i>HEPES</i>	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1ethansulfonsäure
<i>HBSS</i>	Hank's Buffered Saline Solution
<i>H₂O₂</i>	Wasserstoffperoxid
<i>IARC</i>	International Agency For Research On Cancer
<i>kg</i>	Kilogramm
<i>Kli</i>	Klinker
<i>KSM</i>	Kalksteinmehl
<i>LDH</i>	Laktatdehydrogenase
<i>LMP</i>	Low melting point
<i>M</i>	Molar
<i>mg</i>	Milligramm
<i>min</i>	Minute
<i>mL</i>	Milliliter
<i>MTT</i>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<i>NMP</i>	Normal melting point

$\cdot OH$	Hydroxylradikal
OTM	Olive tail moment
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
PM	Particulate matter, Feinstaub
ROS	Reactive oxygen species, reactive Sauerstoffspezies
Tab.	Tabelle
TiO₂	Titaniumdioxid
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
u.a.	unter anderem
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
VDZ	Verein Deutscher Zementwerke

1 Einleitung

Seit vielen Jahren stehen Erkrankungen und ihr Zusammenhang mit unterschiedlichen Risikofaktoren im Mittelpunkt der Forschung. Der Fokus vieler Untersuchungen liegt mitunter auf den Einwirkfaktoren am Arbeitsplatz oder auf der täglichen Umgebung des Menschen. Einige Arbeiten beschäftigen sich unter anderem mit den Karzinomen der oberen Luftwege und ihrer Entstehung im Zusammenhang mit der Umwelt.

Aktuell rückt die Belastung der Umwelt mit Schwebestaub sowie Staubexposition am Arbeitsplatz ins öffentliche Interesse. Dabei wird vor allem inhalierbaren Feinpartikeln von einer Größe PM10 (Partikulate Matter 10 μm Durchmesser) oder PM5 ($\leq 5 \mu\text{m}$ Durchmesser) und der komplexen Zusammensetzung dieser aus Schwermetallen, organischen, sauren, alkalischen und anderen Komponenten eine große Beachtung geschenkt. Die Gemische aus feinen, ultrafeinen und nanofeinen Stäuben entstehen bei Verbrennungsprozessen jeglicher Art, im Straßenverkehr, bei industriellen Vorgängen, im Bergbau, beim Rauchen sowie auch bei Bauarbeiten.

Größere Partikel werden durch die natürlichen Reinigungsmechanismen des menschlichen Körpers, wie zum Beispiel der mucozilären Clearance zurückgehalten. Die Nasenschleimhäute sind jedoch nicht in der Lage die feinen Staubpartikel zu retenieren, deshalb gelangen diese beim Einatmen über den Respirationstrakt bis in die Alveolen der Lunge. Da diese Partikel keine Gase sind, sondern feste Stoffe können sie dort weder umgesetzt noch ausgeatmet werden – sie verbleiben unverändert in der Lunge. (www.huss-umwelt.com)

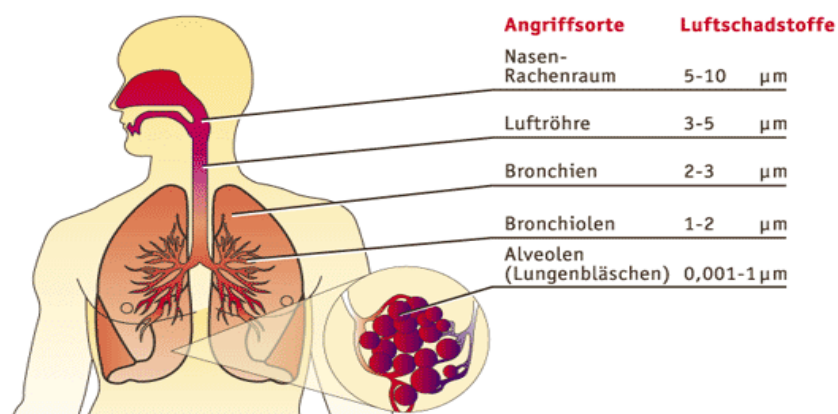


Abbildung 1: Der Durchgängigkeit der einzelnen Partikelgrößen durch die Luftwege. (Quelle: www.huss-umwelt.com)

Das Gelangen und das Persistieren der Partikel in den Atemwege führt im Verlauf zu inflammatorischen Reaktionen (Borm and Tran, 2002), die akute und chronische Erkrankungen der Atemwege hervorrufen.

Umweltaerosole werden getestet, um eine Risikowarnung an die Allgemeinheit auszusprechen. Eine der Studien richtete ihre Aufmerksamkeit den Verbrennungsaerosolen. Dibatié und seine Arbeitsgruppe untersuchten in vielen in vitro Versuchen die Auswirkungen der Flugasche auf unterschiedliche Stammzellen aus der Lunge von Mensch und Ratte. Daneben wurden auch Modellpartikel eingesetzt, unter anderem der Dörentruer Quarz DQ12. Man fand heraus, dass mit abnehmender Partikelgröße die zytotoxische Wirkung zunahm. Auch die Wasserlöslichkeit bestimmt über die toxische Wirkung von Partikeln, je löslicher diese waren, desto geringer war die Toxizität. Des Weiteren zeigte sich, dass die mit $\text{TNF}\alpha$ oder Lipopolysacchariden (LPS) stimulierte Zellen stärker auf die Exposition mit den Partikeln reagierten. Da die Ursache der Toxizität in dem induzierten oxygenen Stress gesucht wird, konnte mit Hilfe von Radikalfängern die ROS-Bildung reduziert oder vollständig gehemmt werden. Somit zeigte diese Studie deutlich, dass Schwebstaub bei empfindlichen Personen Krankheiten auslösen bzw. verschlimmern kann, indem in das sensible Abwehrsystem eingegriffen wird.

Die Schwebstaubbelastung begegnet uns auch auf dem Arbeitsplatz. Bei Bauarbeiten bilden die Baustoffe einen hohen Anteil an inhalierbaren Partikeln, zu denen auch Zemente gezählt werden.

Zement ist ein Baustoff, der durch seine chemische Zusammensetzung in der Lage ist mit Wasser zu reagieren und für andere Bausubstanzen als eine Art Kleber zu fungieren, indem er diese verbindet und erhärtet (www.vdz-online.de). Aus diesem Grund sind Zemente die meist verwendeten Baumaterialien.

Tausende von Bauarbeitern sind täglich der Exposition mit Zementen ausgesetzt und vergessen oft seine gesundheitlichen Risiken. Neben Kalziumoxid, das vor allem für die alkalischen Eigenschaften verantwortlich ist, enthalten Zemente Spurenelemente wie Chrom und Nickel, Siliziumdioxid und Anteile von Quarz. Diese Stoffe können im nassen sowie im trockenen Zustand, als Staub bzw. Partikel gesundheitliche Schäden verursachen. Die betroffenen Organe sind Haut, Augen, Nase, die ganzen oberen Luftwege und die Lunge. Außer nicht malignen Krankheiten beobachtet man auch maligne Prozesse. Beim direkten Kontakt der Haut mit Zementen führt vor allem die Alkalität zu Irritationen. Es können neben Verbrennungen und Ulzerationen auch

Hautdermatitis entstehen, beim gelangen von Zement in die Augen kommt es zu Reizungen und Entzündungen. Daneben stellt das Inhalieren von Zementstaub einen der schwerwiegendsten Probleme dar, dabei gelangen die Zementpartikel über die Nase, den Mund und restlichen Luftwege in die Lunge und richten bereits auf dem Weg zahlreiche Schäden an. Entzündungen und chronische Lungenerkrankungen wie COPD (chronical obstructive pulmonary disease), chronische Bronchitis und Silikose unter anderem hervorgerufen durch kristallinen Quarz sind die Folge. (www.elcosh.org; www.osha.de)

Die Rhein-Neckar-Larynx-Studie nahm besonders das Karzinom des Larynx (die Inzidenz liegt in Deutschland bei 5-10/100000 (www.tumorzentrum-son.de/leitlinien)) zum Gegenstand ihrer Forschung und betrachtete in einer Fall-Kontroll-Studie neben dem Rauchen und Alkoholkonsum, das Risiko maligner Effekte ausgehend von Bau- bzw. Zementstaub. So wurde festgestellt, dass Bauarbeiter einem höheren Risiko ausgesetzt sind an einem Larynx-Karzinom zu erkranken, insbesondere aufgrund der Belastung mit Bauzementen (Dietz et al., 2004).

1.1 Fragestellung

Aufgrund der Ergebnisse der epidemiologischen Rhein-Neckar-Studie wuchs der Verdacht, dass Bauzemente neben den bekannten akuten und chronischen Erkrankungen auch Krebserkrankungen verursachen können. Zu den toxikologischen Auswirkungen gibt es jedoch kaum Erkenntnisse oder Untersuchungen.

Mit dieser Arbeit wird die epidemiologische Rhein-Neckar-Studie aufgegriffen und es wird versucht die Ergebnisse dieser Studie mit Hilfe von in vitro Untersuchungen nachzuvollziehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Zemente A-D, Klinker und Kalksteinmehl europäischer Herkunft auf zytotoxische und gentoxische Effekte auf humane Lungenzellen der Linie A549. Es wird die Wirkung der Zementpartikeln, suspendiert in Hank's BSS und als Zementsuspension bezeichnet, mit Hilfe etablierter Testverfahren untersucht und ausgewertet.

Zum Nachweis einer Zytotoxizität wird der Erythrosin B- und der WST-1-Assay zum

Einsatz kommen.

Des Weiteren soll mittels Comet-Assay geprüft werden, ob sich durch eine Belastung der Lungenzellen mit den Zementstäuben eine Genotoxizität nachweisen lässt.

Die Ergebnisse stellen insgesamt einen Beitrag zu einer kritischen Bewertung der gesundheitlichen Wirkung von Zementstäuben in humanen Lungenzellen dar und sollen damit Hinweise über deren gesundheitliche Wirkung für Menschen am Arbeitsplatz liefern.

1.2 Vorstellung der Testsysteme

1.2.1 WST-I-Essay

Zur Überprüfung der zytotoxischen Effekte auf die verwendeten Lungenzellen der Stammzellreihe A549 wurde das Testsystem mit dem WST-1 (water soluble tetrazolinium) verwendet.

WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) ist ein Farbstoff, der seinen Einsatz bei den Proliferationssays findet, die benutzt werden, um die Anzahl der lebensfähigen Zellen zu bestimmen. In dieser Arbeit wird für die Bestimmung der Zellvitalität dieser Farbstoff aufgrund seiner reagiblen Eigenschaften verwendet. An der Reaktion des Tetrazolinium-Salzes, im Medium gelöst, wird die Aktivität der Zellen gemessen.

Das Tetrazolinium-Salz wird mit Hilfe der Succinat-Tetrazolinium-Reduktase im Rahmen einer Reduktionsreaktion zum Tetrazolam-(Formazan)-Farbstoff gespalten. Dieses Enzym ist in der Atmungskette in den Mitochondrien eingebaut und ist nur in lebensfähigen Zellen aktiv.

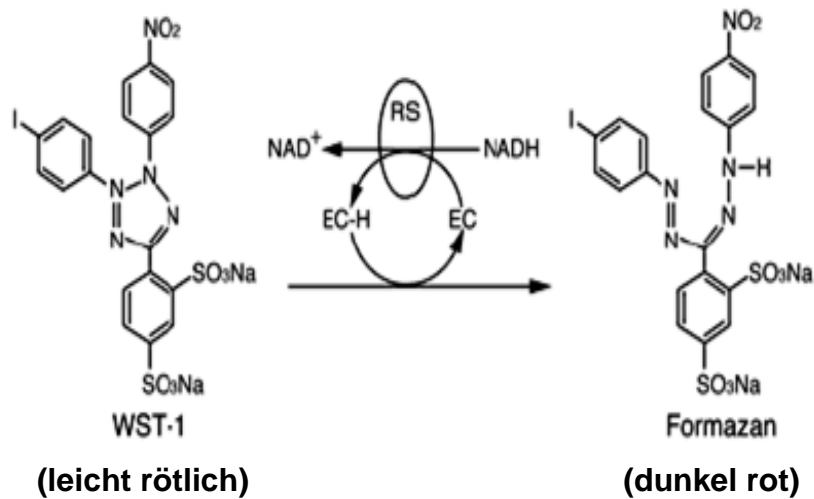


Abbildung 2: Reaktionsweg des Tetrazoliniumsalzes zu Formazan (EC = Elektronenaufnehmer; RS = Succinat-Tetrazoliniumreduktase)

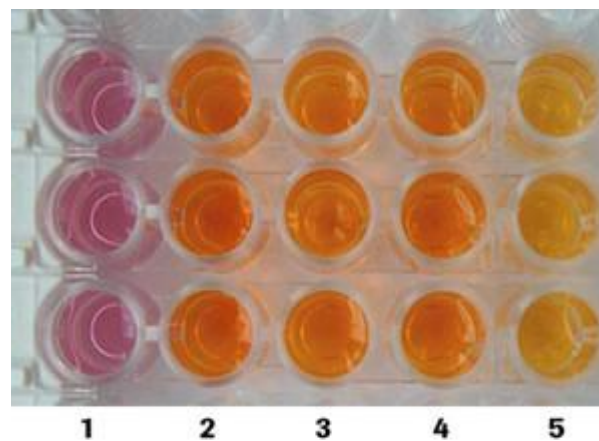


Abbildung 3: Farbpalette des Reaktionsweges des WST-1 (1= hohe Zellaktivität, 5= geringe Zellaktivität)

Mit Hilfe eines Spectralphotometers (Elisa) kann die Absorption des Farbstoffes, welche sich linear zur Aktivität der Zellen verhält, bei der Wellenlänge von 450 nm detektiert und ausgewertet werden. (Roche Applied Science, Berridge, et al., 1996)

1.2.2 Erytrosin B-Assay

Ein weiteres Testsystem, das seine Anwendung in dieser Arbeit findet, ist das Erytrosin B-Assay.

Mit dem Erytrosin B-Farbstoff lässt sich zum einen die Zellzahl einer Zellkultur, zum anderen die Vitalität der Zellen bestimmen.

Durch die Substanz Erytrosin B werden tote Zellen rot angefärbt, so dass sie unter einem Mikroskop sichtbar werden. Die Methode beruht darauf, dass der Farbstoff die intakte Membran der Zellen nicht überwinden kann, jedoch die poröse Zellmembran der toten Zellen passiert und sie rot einfärbt.

Die Zählung der Zellen erfolgt mit Hilfe der Neubauer Zählkammer, vom Ergebnis kann dann über einen Rechenweg (s. S. 25) auf die Anzahl der Zelle in einem Mikroliter geschlossen werden.

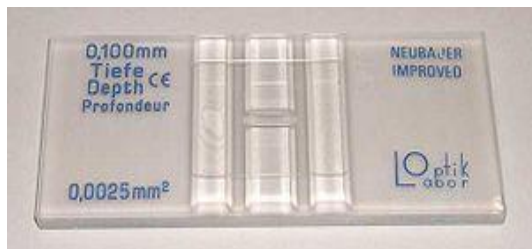


Abbildung 4: Neubauer Zählkammer mit Deckglas

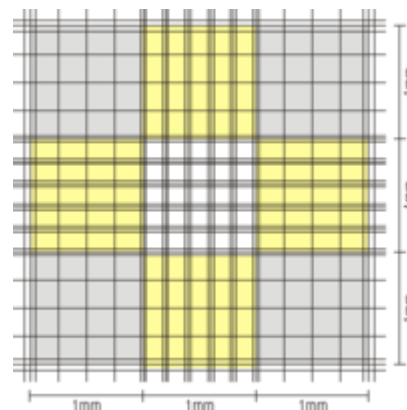


Abbildung 5: Aufbau des Zählfeldes

1.2.3 Alkalische Einzelgelelektrophorese (Comet-Assay)

Zur Testung der gentoxischen Auswirkungen der Testsubstanzen wurde in dieser Studie die alkalische Einzelgelelektrophorese verwendet.

Die Einzelzellgelelektrophorese (engl. single cell gel electrophoresis) oder Comet-Assay ist eine sehr sensible Methode, die heutzutage in vielen verschiedenen wissenschaftlichen Forschungen ihren Einsatz findet. Dieses Testsystem erlaubt DNA-Schäden auf der Ebene einzelner Zellen nachzuweisen und als DNA-Migration sichtbar und damit auch messbar zu machen (Wojewodzka et al., 2001; Tice und Strauss, 1995).

Zuerst wurde in einem neutralen System, beschrieben von O. Ostling und K. J. Johanson (1984), gearbeitet. Dabei konnten vor allem die Einzelstrangbrüche als gentoxische Wirkung markiert werden (Anderson et al., 1989), die jedoch schnell zu

reparieren waren und keine genügenden mutagenen Veränderungen aufzeigten (Collins et al., 1997).

Das alkalische System, entwickelt bei Singh et al. 1988 und Olive 1989, gibt die Möglichkeit zusätzlich DNA-Doppelstrangbrüche zu betrachten, was zu einer Erhöhung der Sensitivität des Testsystems führt. Jedoch verursachen viele gentoxische Substanzen keine oder kaum DNA-Strangbrüche direkt. Es entstehen vor allem alkalilabile Stellen, die dann bei einem pH-Wert von >13 aufbrechen. Außerdem können mit dieser Methode die erhöhten Reparaturaktivitäten aufgezeigt werden, die durch Läsionen an zu reparierenden Stellen imponieren. (Collins et al., 1997)

Zellen mit lädierter DNA weisen unter Fluoreszenzmikroskop einen Schweif, der die Migration der DNA aus dem Zellkern darstellt, auf. Der Kopf des Kometen ist der Zellkern. Der Anteil von DNA in dem Kometenschweif und seine Länge sind ein Maß für die DNA-Schädigung durch die getestete Substanz. Zellen mit unbeschädigter DNA zeigen keine Kometen. (Tice et al., 2000, Olive et al., 1990)

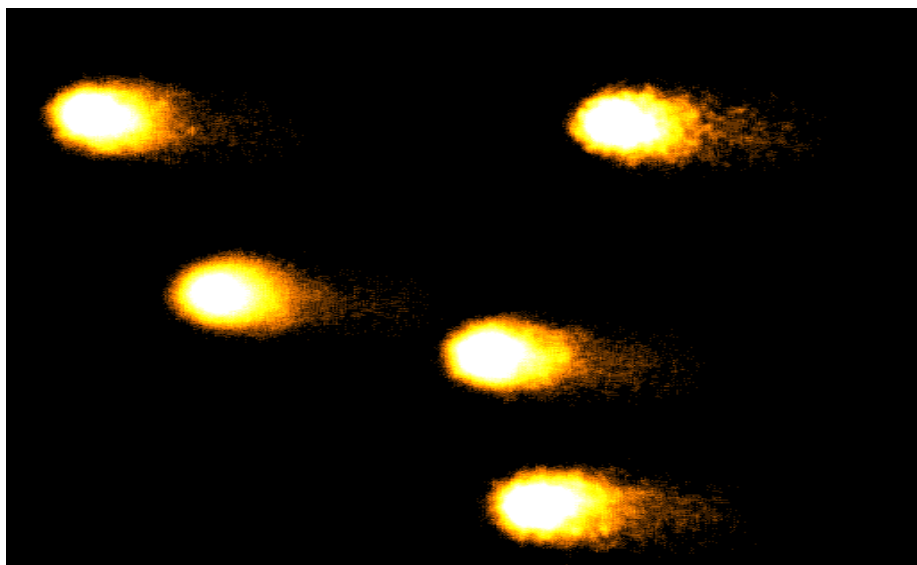


Abbildung 6: Darstellung der Kometen in A549-Lungenzellen

Das Aussehen der Kometen ist je nach der Stärke der DNA-Zerstörung unterschiedlich. Zuerst kommt es zur Auflockerung der DNA-Schleifen, die sich im Kometen-Schweif wiederfindet. Je mehr von den DNA-Schleifen entstehen, desto mehr davon wandern in den Schweif und erhöhen damit seine Intensität. Die Länge wird kaum verändert, sie wird wiederum nur durch die Größe der DNA-Fragmente bestimmt. Zudem führen auch Apoptose und Nekrose zur Ausbildung von Kometen.

Es ist bis heute noch umstritten, ob die Vorgänge nur durch gentoxische Effekte oder auch durch die Zytotoxizität verursacht werden. Die Schwierigkeit liegt darin zu unterscheiden, ob die Induktion der DNA-Migration durch das eine oder durch das andere hervorgerufen wird (Storer et al., 1996), wobei eine zu starke Zerstörung durch die Betrachtung der einzelnen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist, denn durch die exzessive Zytotoxizität zeigen die geschädigten Zellen so eine starke DNA-Streuung, dass kein Zellkern erkennbar ist (Hartmann und Speit, 1997). Um diesen Effekten vorzubeugen, sollte die zytotoxische Wirkung einer Substanz im Voraus limitiert werden. Henderson et al. beschreibt in seiner Publikation, dass eine Zellvitalität von mehr als 75% vorhanden sein muss, um im Comet-Assay falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Storer fand in seiner Revalidierung eine 70%ige Zellviabilität als genügend, um bei den bekannten Wirkungen seiner getesteten Substanzen auf 92% der Übereinstimmungen zu kommen.

Die Durchführung des Comet-Assay sieht vor Zellen, die zuvor einer zu testenden Substanz ausgesetzt wurden, in Agarose gebettet, auf einen Objektträger aufzutragen. Nach einer Lyse bei einem pH-Wert von 10-12 werden die Objektträger in einer alkalischen Elektrophoreselösung mit einem pH-Wert von >13 nach einer kurzzeitigen Lagerung einer Elektrophorese unterzogen. Das alkalische Milieu bewirkt ein Entwinden der DNA aufgrund der Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen, so dass die geschädigte DNA aus dem Zellkern in Richtung Anode durch das Gel wandert. Hochmolekulare nicht geschädigte DNA kann den Zellkern nicht verlassen. Nach dem Waschvorgang werden die Objektträger mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z.B. Ethidiumbromid) angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Tice et al., 2000, Olive et al., 1990, Hartman et al., 2003).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendetes Material und Hersteller

Chemikalien	Hersteller
0,5% Low Melting Point Agarose	Serva, Heidelberg
0,7% Normal Melting Point Agarose	Merck, Darmstadt
1% Normal Melting Point Agarose	Serva, Heidelberg
Aceton	Serva, Heidelberg
Agarose (Low Melting Point)	Merck, Darmstadt
Agarose (Normal Melting Point)	Merck, Darmstadt
DMEM (Dulbecco's minimal essential medium)	PAA, Pasching/Austria
Dulbecco's PBS	PAA, Pasching/Austria
EDTA Dinatriumsaltz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Roth, Karlsruhe
Erythrosin B	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	Sigma- Aldrich, Steinheim
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA, Pasching/Austria
HBSS (Hank's Buffered Saline Solution)	PAA, Pasching/Austria
HEPES	Sigma, München
Kalksteinmehl	VDZ Deutsche Zementindustrie, Düsseldorf
Klinker	VDZ Deutsche Zementindustrie, Düsseldorf
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Dörentruper Quarz	IUFZ, Düsseldorf

Titandioxid (Anatase)	IUFZ, Düsseldorf
Tris Puffer	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	PAA, Pasching/Austria
Wasserstoffperoxid 30% H ₂ O ₂ (Perhydrol)	Merck, Darmstadt
Zement A, B, C, D	VDZ Deutsche Zementindustrie, Düsseldorf

Geräte und besondere Materialien	Hersteller
Comet Programm	Systat, Comet 5.0, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, GB
Elektronikrührer	Thermo Fisher Scientific, Variomag, Deutschland
Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresekammer	Biostep, Jahnsdorf
FalconTube 10 und 50ml	Greiner, Flacht
Feinwaage	OHAUS Pine Brook (US)
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Solms
Inkubator	WTC Binder, Tuttlingen
Laminar Flow Bench	Kendro Laboratory Products
Lichtmikroskop	Leica, Solms
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Objektträger, ganz matiert	Langenbrink, Emmendingen
Ofen	Memmert, Schwabach
pH-Meter	inoLab (WTW), Weilheim
Ultraschall-Kompaktgerät	Roth, Karlsruhe
Standröhrchen	Greiner, Flacht
Vakuum-Saugpumpe	HLC, Bovenden
Vortexer	IKA, Staufen
Waage	SCALTEC, Göttingen
Wasserbad	Medingen
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zellkultur(Gewebe-)Schale, 12 well	Greiner, Flacht

2.1.2 Lösungen

Agaroselösungen für Objektträgerbeschichtung

1. Schicht:	1%	Normal Melting Point Agarose	0,5 g
		Auf 50 mL PBS	
2. Schicht:	0,7%	Normal Melting Point Agarose	0,14 g
		Auf 20 mL PBS	
3. Schicht	0,5%	Low Melting Point Agarose	0,1 g
		Auf 20 mL PBS	

Elektrophoresepuffer

pH > 13:	NaOH (0,3 M)	12 g.
	EDTA- Titriplex (1 mM)	10 mL (von 0,1 M Stammlösung)
	Auf 1 L Aqua dest.	

LyseLösung

pH= 10:	NaCl (2,5 M)	146,1 g
	EDTA- Titriplex (100 mM)	37,224 g
	NaOH (0,2 M)	8 g
	Triton-X-100 (1%)	2 mL
	(auf 200 mL Lysestammlösung kurz vor Gebrauch)	

Neutralisationspuffer

pH= 7,5:	Tris (0,4 M)	48,44 g/L
	Auffüllen	

2.1.3 Zellkultur

Für die Experimente wurden Zellen der Zelllinie A549 herangezogen.

Die A549-Zelllinie stammt ursprünglich aus einem Tumor, der im Jahr 1972 aus der Lunge eines 58-jährigen Kaukasiers entfernt wurde. Die Zellen des Tumorgewebes wurden dann für mehr als drei Jahre und über 1000 Generationen in vitro exprimiert. Diese Adenokarzinomzellen besitzen den menschlichen Karyotyp und imponieren durch ihre Morphologie, ihre Zellorganellen und den Besitz von multilamellären Körperchen den Alveolar Typ II Zellen der menschlichen Lunge. Auch nach vielen Teilungen behielten diese Zellen viele Eigenschaften und Funktionen der Mutterzellen. Darunter fällt die Fähigkeit bestimmte Enzyme zu produzieren, die für die Synthese von verschiedenen Phospholipiden benötigt werden und damit die Synthese von Lungensurfactant (physiologischen Schutzschicht der Lungenzellen) ermöglichen.

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zellen der A549-Zelllinie den Alveolar Typ II Zellen sehr ähnlich und damit für experimentelle Untersuchungen mit Bezug auf die menschliche Lunge geeignet sind. (Lieber et. al., 1976)

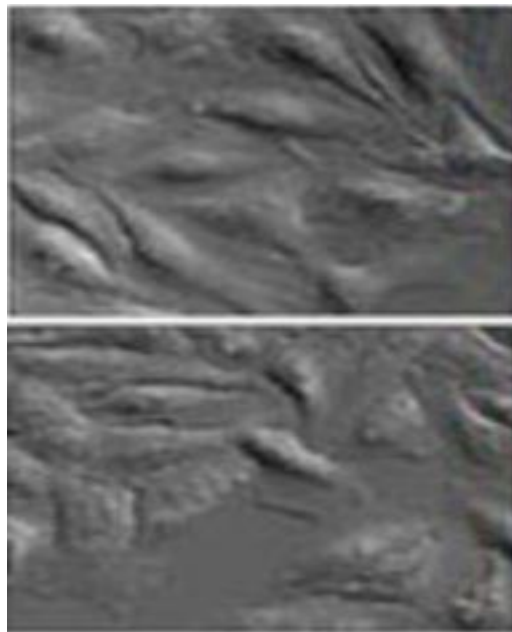


Abbildung 7: A549 Zellen unter Subkonfluenz mit ca. 80% (Quelle: www.sigmaaldrich.com)

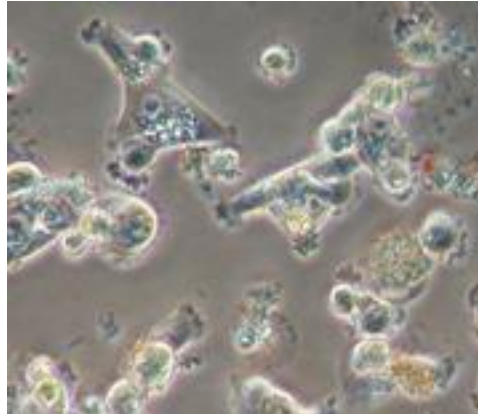


Abbildung 8: Diese Abbildung stellt Lungenzellen unter Einwirkung von toxischen Substanzen (z.B. H₂O₂) dar. So zeigen sich die ersten Anzeichen der Zytotoxizität, wenn die Zellen sich abrunden und von der Unterlage ablösen. (Quelle: www.idw-online.de)

2.1.4 Referenzen

Als Referenzen kommen Medium (DMEM) als Lösungsmittelkontrolle und Wasserstoffperoxid in Konzentrationen 25 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L, 200 µg/L als positive Kontrolle zum Einsatz.

2.1.4.1 Quarz.

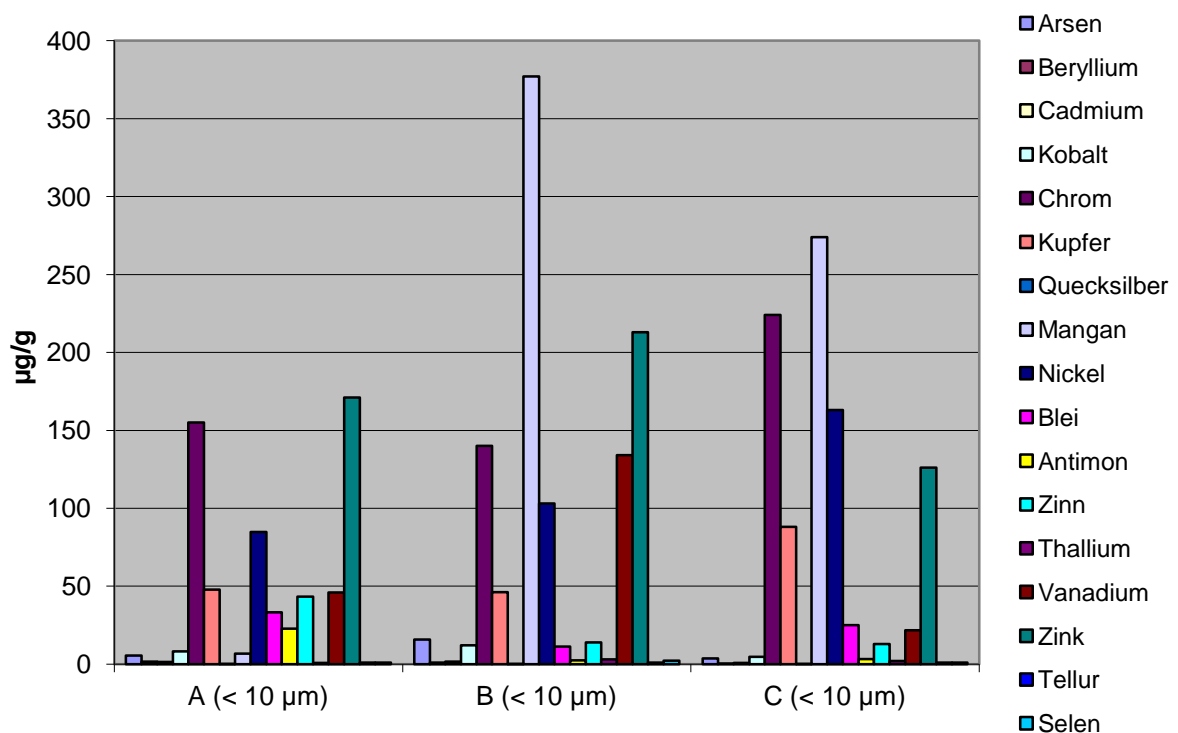
Als weitere positive Kontrolle, vor allem wegen ihrer ähnlichen Beschaffenheit zu den Proben, wird der Dörentruper Kaolinit Sand verwendet. Dieser hat als Standardquarz (DQ12) vor allem in die Lungenkrebsforschung Einzug gehalten. Quarz gilt seit 1997 nach der Klassifikation von der International Agency for Research of Kancer als Karzinogen der Gruppe I, wobei die Wirkmechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Die Effekte, die zu der Zelltoxizität führen, sind neben Entzündungsreaktionen durch Makrophagen und Leukozyten, die zur Bindegewebsvermehrung führen, vor allem die Entstehung von Sauerstoffradikalen (Borm et al., 2000).

2.1.4.2 Titaniumdioxid

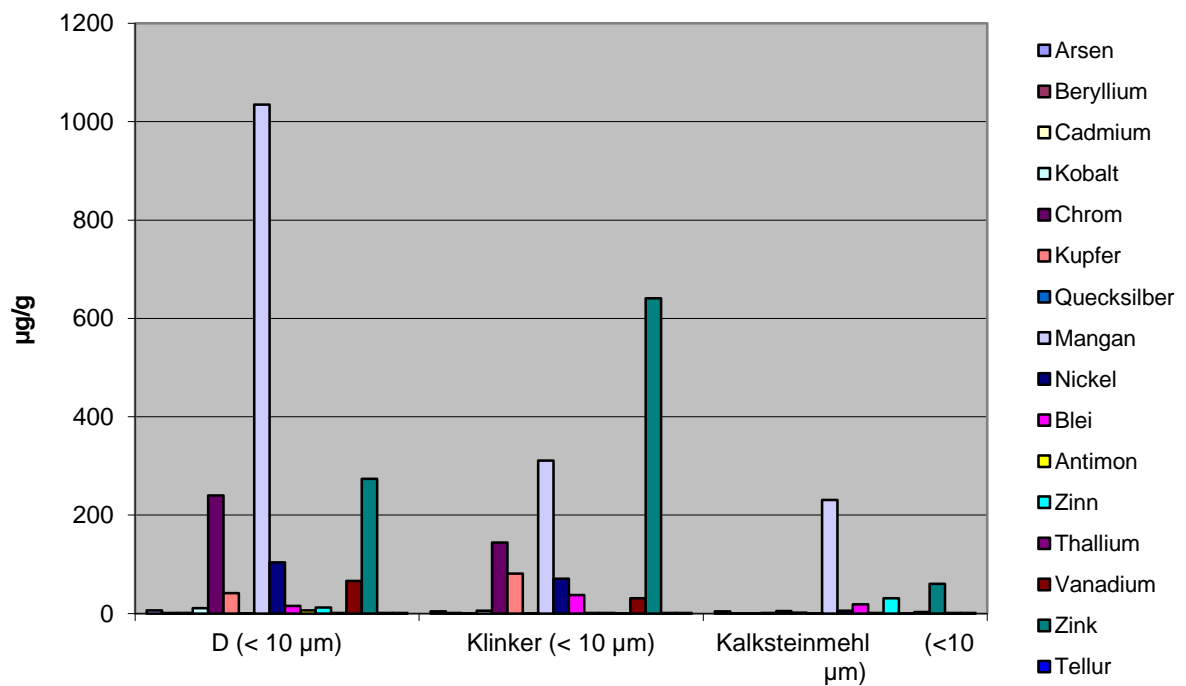
Als eine negative Kontrolle wurde das TiO_2 eingesetzt. Es galt bisher als gesundheitlich unbedenklich. Titaniumdioxid kommt in zwei unterschiedlichen partikulären Größen, fein und ultrafein vor. Die feinen Partikeln, die in dieser Arbeit Verwendung finden, werden immer noch im Gegensatz zu den ultrafeinen Partikeln als unschädlich angesehen.

2.1.5 Zu untersuchenden Proben

Untersucht wurde zum einen Kalksteinmehl, das durch seine nicht toxische Beschaffenheit bekannt ist. Zum anderen wurden vier Portlandkompositzemente (Puzzolan-, Schiefer-, Kalkstein- und Hüttenzement), zur vereinfachten Darstellung mit A, B, C, D benannt, und Klinker in Form einer Suspension auf die Zellen in Konzentrationen $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aufgetragen und geprüft. Die vollständigen Inhaltsstoffe der jeweiligen Zemente sind in den folgenden Graphiken dargestellt.



Graphik 1: Darstellung der Inhaltsstoffe der Zemente, erstellt anhand einer chemischen Analyse (freundlicherweise von VDZ zur Verfügung gestellt)



Graphik 2: Darstellung der Inhaltsstoffe der Zemente, erstellt anhand einer chemischen Analyse (freundlicherweise von VDZ zur Verfügung gestellt)

Die folgende Tabelle zeigt die Kodierung der Zemente für diese Arbeit wie auch die Größe der einzelnen Partikeln und den Anteil der bekannt toxischen Substanz Siliziumdioxid, welche zu einem Anteil von 90% in der hier verwendeten positiven Kontrolle enthalten ist.

Kode	Identifikation	Größe (D50)	Spezifische Oberfläche cm ² /cm ³	SiO ₂ in %
A	CEMII/B-P	1,5- 2,0	89659	26,56
B	CEMII/B-T	1,5- 2,0	85940	20,12
C	CEMII/A-LL	1,5- 2,0	79238	14,76
D	CEMII/A-S	1,5- 2,0	95206	17,51
Kalksteinmehl	VDZ	1,0- 1,5	58803	0,61
Klinker	Klinker			20,82
DQ12-Quarz	IUF	1,0- 2,0		>90

Tabelle 1: Kodierung der Zemente und der Referenzen

Hauptzementarten	Benennung	Kurzbezeichnung	Hauptbestandteile ¹⁾										Nebenbestandteile
			Portland- zementklinker	Hütten- sand	Silke- staub	Puzzo- lane natürlich	Puzzo- lane natürlich getempert	Flugasche kiesel-säure-reich	Flugasche kalkreich	Gebraun- ter Schiefer	Kalkstein		
			K	S	D	P	Q	V	W	T	L	LL	
CEM I	Portlandzement	CEM I	95-100										0-5
CEM II	Portlandhütten- zement	CEM II/A-S	80-94	6-20									0-5
		CEM II/B-S	65-79	21-35									0-5
	Portlandsilica- staubzement	CEM II/A-D	90-94		6-10								0-5
	Portland- puzzolan- zement	CEM II/A-P	80-94			6-20							0-5
		CEM II/B-P	65-79			21-35							0-5
		CEM II/A-Q	80-94				6-20						0-5
		CEM II/B-Q	65-79				21-35						0-5
	Portland- flugasche- zement	CEM II/A-V	80-94					6-20					0-5
		CEM II/B-V	65-79					21-35					0-5
		CEM II/A-W	80-94						6-20				0-5
		CEM II/B-W	65-79						21-35				0-5
	Portland- schieferzement	CEM II/A-T	80-94							6-20			0-5
		CEM II/B-T	65-79							21-35			0-5
	Portland- kalkstein- zement	CEM II/A-L	80-94								6-20		0-5
		CEM II/B-L	65-79								21-35		0-5
		CEM II/A-LL	80-94									6-20	0-5
		CEM II/B-LL	65-79									21-35	0-5
	Portlandkompo- sitzement	CEM II/A-M	80-94	6-20									0-5
		CEM II/B-M	65-79	21-35									0-5

Tabelle 2: Zementarten und ihre Zusammensetzung gemäß SN EN 197-1:2000 (auf die Auflistung von CEM III, IV und V wurde verzichtet, da in dieser Arbeit nur ausgewählte Zemente der Art CEM II verwendet wurden)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit den Zellen fanden unter sterilen Bedingungen unter einer Arbeitsbank statt. Die verwendeten Proben und Lösungen waren ebenfalls steril oder wurden sterilisiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank mit einer Luftfeuchtigkeit von 95%, unter 5% CO₂-Atmosphäre bei 37°C.

Vor dem Beginn der Zellkultivierung wurden die benötigten Chemikalien im Wasserbad bei 37°C erwärmt.

Passagieren von A549

Die Kulturflasche mit den Zellen wurde zunächst makroskopisch auf Auffälligkeiten, wie Farbumschlag des Mediums, untersucht, dann mikroskopisch auf Mikroorganismen oder sonstige Verunreinigungen begutachtet. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellkultur zweimal mit PBS gewaschen, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen.

Für die verwendeten Flaschen (75 cm²) benötigte man zur Ablösung der Zellen vom Kulturmedium eine Trypsinmenge von 3 mL, die gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt wurde. Nach einer 3-5 minütigen Inkubation der Zellkultur im Wärmeschrank wurden die Zellen erneut mikroskopisch betrachtet, um die Zellablösung vom Boden der Flasche festzustellen. Diese durch Trypsin vermittelte Wirkung wurde dann mit 7 mL Vollmedium gestoppt, wonach die gesamte Zellsuspension nach Aufnahme mit einer Pipette und nach mehrmaligem Spülen in ein vorbereitetes Falcon überführt wurde. Die Flasche wurde weiterhin mit 10 mL Vollmedium nachgespült und der Zellsuspension zugefügt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zellzahlbestimmung. Dazu wurden 50 µL der Zelllösung entnommen und in einem 1,5 mL Eppendorf Cup mit Erytrosin B zusammengegeben. Nach kurzem Vortexen pipettierte man von dem Gemisch 10 µL auf eine Neubauerzählkammer. Es wurden 4 Felder mit je 16 kleinen Feldern ausgezählt, wobei die Zellen am linken und am unteren Rand mitgezählt wurden. Die Bestimmung der Zellzahl geschah nach der folgenden Rechnung:

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{L} = \text{gezählte Zahl} \times 10/4 \times 2 \text{ (Verdünnung)}$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl}/\mu\text{L} \times \mu\text{L Zellsuspension (20 000)}$$

Nach der Zellbestimmung wurde ein Teil der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 (1 mL Zellsuspension mit 10 mL Medium) in eine vorbereitete und mit Vollmedium gefüllte Kulturflasche gegeben und in den Wärmeschrank gestellt, der andere Teil wurde entweder für die Versuche gebraucht oder verworfen.

Die Zellpassagierung erfolgte je nach Zellwachstum 2-3 mal die Woche. Am Montag, Mittwoch und Freitag wurden die Zellen 2 mal mit jeweils 10 mL PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

2.2.2 Probenaufbereitung

Die Zementstäube, ausgewogen zu 8-10 mg wurden in Gläschen (20 mL Fassungsvermögen) überführt und mit Alufolie versiegelt. Anschließend wurden alle Stäube 16 Stunden bzw. über Nacht in einem Backofen bei 215°C hitzedeaktiviert, um evtl. vorhandene Endotoxine zu zerstören.

Herstellung einer Stammlösung (Zementsuspension):

Da die zu testenden Stoffe nicht löslich waren, sondern aus granulären Partikeln bestanden, konnten sie nur suspendiert werden. Die Zellbehandlung erfolgte in der Einheit $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, weil die Zementbestandteile sich nach einiger Zeit absetzten und sich auf der Zellkultur verteilten.

Unmittelbar vor jedem Versuchsbeginn wurde eine Stammlösung angesetzt in der Konzentration $400 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Die in dieser Arbeit gebrauchten Well-Platten hatten je nach der Anzahl der Wells unterschiedliche Flächen. Bei der 96-well-Platte, die für den WST-I-Assay verwendet wurde, betrug die Fläche nach Angaben des Herstellers $0,32 \text{ cm}^2$, bei der 12-well-Platte betrug sie nach eigenen Ausmessungen und Berechnungen $3,14 \text{ cm}^2$.

Um die 400 μg auf die Fläche von 1 cm^2 als Endkonzentration zu bekommen, musste eine Umrechnung auf die Fläche von 0,32 cm^2 bzw. 3,14 cm^2 mittels Dreisatz erfolgen. Daraus folgte ein Ergebnis von 128 $\mu\text{g}/0,32 \text{ cm}^2$ bzw. 1256 $\mu\text{g}/3,14 \text{ cm}^2$, dieses auf die jeweiligen Volumina übertragen, bedeutete die Herstellung einer Lösung mit 128 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ bzw. 1256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Beispiel: 128 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ entspricht 1280 $\mu\text{g}/\text{mL}$, daraus folgt: für eine Einwaage von 8 mg Zement wird $8 : 1,28 = \text{mL}$ Lösungsmittel gebraucht). Als Lösungsmittel wurde die Pufferlösung HBSS verwendet. Es musste eine Lösung ohne Eiweißbestandteile (FCS) sein, damit die Effekte der positiven Kontrolle Quarz nicht abgepuffert wurden.

Zur besseren Suspension wurde die Lösung in einem Ultraschallbad mit 100 mL Wasser bei einer Temperatur von 37°C (Sonorex 120 W, 50/60 Hz) für mindestens 10 min. beschallt. Vor jedem Weiterverarbeiten der Stammlösung musste auf eine sorgfältige Durchmischung geachtet werden, das bedeutete ein Vortexen und eine Resuspension mit der Pipette 3-5 mal vor jedem weiteren Arbeitsschritt.

Nach dem Ultraschallbad wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:1 hergestellt. Dafür wurden z. B. 2 mL der Stammlösung mit 2 mL Hank's Solution gemischt, um die Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zu bekommen und so fortgesetzt bis zu einer Konzentration von 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

2.2.3 Durchführung der Experimente

2.2.3.1 WST-1-Assay

Vorbereitungsphase

Zellaussaat:

Vor dem Experimentbeginn mussten 20 000 Zellen 24 Stunden lang in 96-well-Platten kultiviert werden.

Die Behandlung erfolgte so wie bei der Zellpassagierung. Nach dem Absaugen des Mediums und zweimaligen waschen, wurde in die Kulturflaschen das Trypsinreagens gegeben. Nach 5 Minuten wurde die Zellablösungsreaktion mit dem Medium gestoppt und die Zellzahl bestimmt. In jede Vertiefung wurde die benötigte Menge der

Zellsuspension gegeben, mit Medium auf 200 μL aufgefüllt und in den Brutschrank gestellt.

Probenvorbereitung:

Die Zemente wurden ausgewogen und über Nacht bei 215 °C hitzedeaktiviert. Bei diesem Test wurde als positive Referenz Triton-X-100 verwendet. Es wurden 20 μL der Substanz mit 10 mL HBSS vermischt. In die Wells kamen dann 100 und 50 μL der Stammlösung, was einer Konzentration von 0,01% bzw. 0,005% entspricht.

Versuchstag

Belastung der Zellen:

Am Versuchstag beurteilte man als erstes makroskopisch den Zustand und mikroskopisch die Konfluenz (=Ausbreitung der Zellen über die vorhandene Fläche, die bei 80% liegen sollte, da bei vollständiger Bedeckung der Fläche die Zellen einander behindern würden um ihren höchsten Wachstum zu erreichen und die Stoffwechselvorgänge eingeschränkt wären) der Zellen.

Dann wurden die Zementproben zur jeweiligen Stammlösung verarbeitet und Verdünnungsreihen hergestellt. Bei einem Experimentdurchlauf konnten 3 Proben und damit 3 Konzentrationsreihen mit Konzentrationen ab 400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ bis 12,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ gemessen werden.

Als nächstes wurden die Zellen wieder aus dem Brutschrank genommen. Das Medium wurde von den Platten abgeschlagen, indem sie mit den Öffnungen nach unten auf saugfähige Tücher gelegt wurden. Es folgte eine einmalige Waschung mit 200 μL PBS und die Bedeckung der Zellen mit 100 μL HBSS, um die Austrocknung der Kultur zu vermeiden.

Jede Konzentration der Zemente sowie Triton-X-100 0,01% und 0,005% wurden jeweils in vier Wells gegeben. Die restlichen Wells wurden mit HBSS aufgefüllt und als negative Referenz gesehen. Die Zellen wurden den Zementsuspensionen, den positiven und negativen Kontrollen 4 Stunden lang unter Inkubationsbedingungen ausgesetzt.

Auswertung:

Für die Auswertung des Versuches benötigte man eine Färbelösung, für die in diesem Fall der WST-1-Farbstoff dienen sollte. Die Herstellung der Lösung erfolgte am Tag der Färbeaktion. Dafür wurde 1 mL der WST-1-Reaktionslösung mit 19 mL DMEM vermischt.

Die 96-well-Platten wurden nach 4 h aus dem Brutschrank entnommen. Es wurden die Lösungen abgeschlagen und die Platten zweimal mit PBS gewaschen. Folgend erfolgte eine vorsichtige Zugabe von 200 µL der WST-1-Färbelösung in jedes Well und danach 1 Stunde Inkubation unter den bekannten Bedingungen.

Die Auswertung geschah mit Hilfe von Elisa, wobei bei 450 nm/620 nm die Absorption gemessen, in Excel-Tabellen übertragen und im Computer gespeichert wurde. Aus den vielen Messwerten wurde für die jeweilige Konzentration ein Mittelwert berechnet und in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{Vitalität in \%} = \frac{\text{Mittelwert der Probe}}{\text{Mittelwert der negativen Kontrollen}} \times 100\%$$

Damit ließ sich die Vitalität der Zellen in % berechnen.

2.2.3.2 Erythrosin B-Assay

Es wurden 50 µL der Zelllösung (verdünnt auf 20 mL) entnommen und in einem 1,5 mL Eppendorf Cup mit 50 mL Erytrosin B zusammengegeben. Nach kurzem Vortexen pipettierte man von dem Gemisch 10 µL auf eine Neubauerzählkammer. Es wurden 4 Felder mit je 16 kleinen Feldern bei einer 100 fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei die Zellen am linken und unteren Rand mitgezählt wurden. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden nur ungefärbte Zellen, für die Zellvitalitätsbestimmung beide Arten gezählt.

Die Ermittlung der Werte geschah nach den folgenden Rechnungen:

$$I. \text{ Zellzahl}/\mu\text{L} = \text{gezählte Zahl} \times 10/4 \times 2 \text{ (Verdünnung)}$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl}/\mu\text{L} \times \mu\text{L Zellsuspension (20 000)}$$

$$II. \text{ Zellvitalität (\%)} = \frac{\text{Erytrosin- B neg. Zellen}}{28} \div \frac{\text{(Erytrosin- B neg. Zellen)} + \text{(Erytrosin- B pos. Zellen)}}{28}$$

2.2.3.3 Alkalische Einzelgelelektrophorese (Comet-Assay)

In dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll, das bereits bei Singh et al. beschrieben wurde, verwendet. Alle Zeiten wurden für diese Versuche standardisiert.

Im folgenden ist eine schematische Übersicht des Ablaufs des Versuches abgebildet:

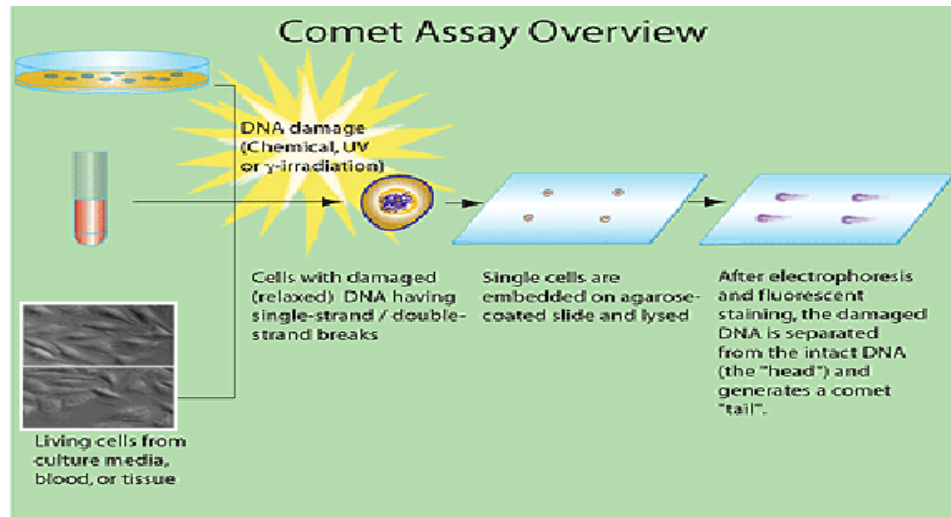


Abbildung 9: Darstellung des Ablaufs des Versuches (Quelle: www.sigmaaldrich.com; (mit Bearbeitung))

Vorbereitungsphase

Zellaussaat:

Für die Durchführung des Versuches mussten die Zellen 24 Stunden vor dem Versuchsbeginn in 12-well-Platten kultiviert werden. Die Behandlung erfolgte wie bei der Zellpassagierung. Aus den Kulturflaschen wurde das Medium abgesaugt, nach dem zweimaligen Waschen wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst. Nachdem die Reaktion mit Medium gestoppt wurde, konnte die Zellzahl bestimmt werden. In jede Vertiefung der 12-well-Platten wurden dann 100 000 Zellen gegeben, mit Medium auf 2 mL aufgefüllt und in den Brutschrank gestellt.

Objekträgerbeschichtung:

Zunächst wurde 1% Agaroselösung hergestellt, indem 0,5 g Agarose in 50 mL PBS-Puffer gegeben und unter ständigem Rühren und Erhitzen auf 200° C gelöst wurde. Die

angerauten Objektträger wurden mit Ethanol abgespült und entfettet. Nach dem vollständigen Auflösen des Agarosepulvers wurde die 1. Schicht auf die Objektträger pipettiert und gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden diese kodiert, denn die Auswertung sollte blind erfolgen, in einen Rack sortiert und in einen Trockenschrank mit 37°C, um die Beschichtung austrocknen und aushärten zu lassen, gestellt. Nach 24 h konnten die Objektträger bei Raumtemperatur gelagert werden.

Probenvorbereitung:

Zemente und die Kontrollen wurden 24 h vor dem Versuch ausgewogen und hitzedeaktiviert.

Versuchstag

Zu Beginn wurden die Zellkulturplatten makroskopisch und mikroskopisch beurteilt, um mit dem Versuch starten zu können.

Als Nächstes wurden die Zementproben und die Kontrollen, gemäß dem Protokoll der Probenaufbereitung auf Seite 25, zu Suspensionsstammlösungen verarbeitet und die Verdünnungsreihen hergestellt.

Dann widmete man sich wieder der Zellkultur. Nach Absaugen des Mediums wurde die Zellkultur zweimal mit jeweils 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Um die Austrocknung der Zellen zu vermeiden, wurde in jede Vertiefung 1 mL Hank's BSS vorgelegt. Damit konnten die Suspensionen der Zemente, der Positivkontrolle DQ12 und der Negativkontrolle TiO₂ in Ruhe jeweils zu einem ml in jeweiliger Konzentration beigelegt werden, wobei häufiges Vortexen und Mischen der Lösungen erforderlich war. Zusätzlich wurde auf jeder Platte ein Well nur mit HBSS, als zweite Negativkontrolle, und ein weiteres Well mit 950 µL HBSS, welches nach zwei Std. mit 50 µL H₂O₂ (= zweite Positivkontrolle) vervollständigt wurde, aufgefüllt. Die behandelten Zellplatten wurden in den Inkubator überführt und für 4 Stunden bei 5% CO₂ und 37°C exponiert.

In der Zwischenzeit wurden alle benötigten Lösungen für die Versuchsdurchführung frisch fabriziert, unter anderem 0,7%ige NMP- und 0,5%ige LMP- Agaroselösung. Dazu wurde PBS-Puffer mit den jeweils zugefügten Mengen (s. S. 18) erhitzt. Für die 2. Schicht wurden 100 µL der 0,7%igen Agaroselösung auf die vorbereiteten Objektträger gegeben, mit Deckgläschen blasenfrei bedeckt, gleichmäßig verteilt und für mindestens

15 min im Kühlschrank aufbewahrt. Zudem wurden 200 mL einer Lyselösung in einer Schieferdeckerkammer angesetzt und bei 4 °C gelagert.

Aufbereitung der Zellkulturen:

Von den Zellkulturplatten wurde nach 4 Std. das Hank's BSS abgesaugt und zweimal mit 1 mL PBS sorgfältig gewaschen. Sofort wurden 500 µL Trypsin zugefügt, nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die Beurteilung der Zellablösung unter dem Mikroskop. Bei nicht erfolgreicher Trypsinierung wurden noch einmal 500 µL Trypsin zugefügt. Anschließend beendete man die Reaktion mit Medium im Verhältnis 1:1, versuchte mit einer Pipette möglichst alle Zellen vom Boden abzulösen und überführte die Zellsuspension in die dafür vorbereiteten 10 mL Eppendorfbehälter. Ab diesem Zeitpunkt wurde im Dunkeln bzw. unter Rotlicht gearbeitet, um phototoxische Schäden an den Zellen zu vermeiden.

Aus jedem Behälter wurden 50 µL Zellsuspension entnommen und in die 1,5 mL Eppendorfgefäße übertragen um die Vitalkontrolle mit Hilfe des Erytrosin B-Assays (s. S. 28) durchzuführen.

Die restliche Zellsuspension wurde bei 4°C und 1200 Umdrehungen/min in einer Zentrifuge zentrifugiert. Nach dem Vorgang erfolgte die Dekantierung des Überstandes, indem die Röhrchen auf einem Papiertuch abgetropft wurden. Das Zellpellet wurde mit 150 µL der 0,5%igen LMP-Agarose, die vorher erhitzt und auf ca. 40°C abgekühlt wurde, resuspendiert und mit Vortex gemischt. Folgend wurden 100 µL der Zell-Agarose-Mischung auf die präparierten Objektträger aufgebracht, mit einem Deckgläschen bedeckt und bei 4°C gekühlt.

Lyse:

Nach 15-minütiger Kühlungszeit wurden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger in die Kammer mit der Lyselösung einsortiert, um mindestens eine Stunde im Kühlschrank zu verweilen.

Elektrophorese:

Nach dem die Elektrophoresekammer auf 4°C abgekühlt und der Elektrophoresepuffer in die Kammer gefüllt wurde, konnten die Objektträger aus der Lyselösung entnommen und in die Kammer einsortiert werden. Nach 20-minütiger Inkubationszeit wurde der

Vorgang bei einer Stromstärke von 300 mA und einer Spannung von 25 Volt (diese Bedingungen wurden durch Entnahme und Zugabe des Puffers erreicht) gestartet.

Neutralisation:

Nach 25 min. wurden die Objektträger aus der Kammer genommen und in eine Schiefferdeckerkammer einsortiert. Durch Zugabe der Neutralisationslösung wurden die Objektträger 10 min. lang neutralisiert, danach der Puffer entfernt, die Objektträger zweimal mit Aqua dest. vorsichtig gespült und zum Trocknen ausgelegt. Nach einer Trockenzeit von etwa 10 min. konnten die Objektträger in ein Rack einsortiert und bei Zimmertemperatur gelagert werden.

Auswertung der Zytotoxizität:

Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe des Erytrosin B-Assays bestimmt. Alle Experimente wurden bei einer Zellvitalität > 70% ausgewertet. Außerdem wurden auch nur die Konzentrationen im Comet-Assay eingesetzt, die keine Zytotoxizität im WST-1-Assay aufwiesen.

Färbung:

Das Anfärben der Objektträger erfolgte unmittelbar vor dem Auswerten. Dafür wurden 60 µL der Ethidium-Bromidlösung, wobei bei Titaniumdioxid der Farbstoff Acridin-Orange verwendet wurde, auf die Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen verteilt. Diese wurden dann auf einen angefeuchteten Tuch in eine Kammer einsortiert, um das Austrocknen der Farbe zu vermeiden.

Auswertung:

Für die Auswertung stand ein Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung. Dieses war mit einer Kamera ausgestattet, die die Verbindung zum Computer herstellte. Es wurden pro Objektträger 100 Zellen mit dem Programm Comet 5.0 von Systat (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, GB) ausgemessen und der Parameter Olive Tail Moment (OTM= ein Produkt aus Schweiflänge und dem Anteil der DNA im Schweif bzw. Schweifintensität) betrachtet.

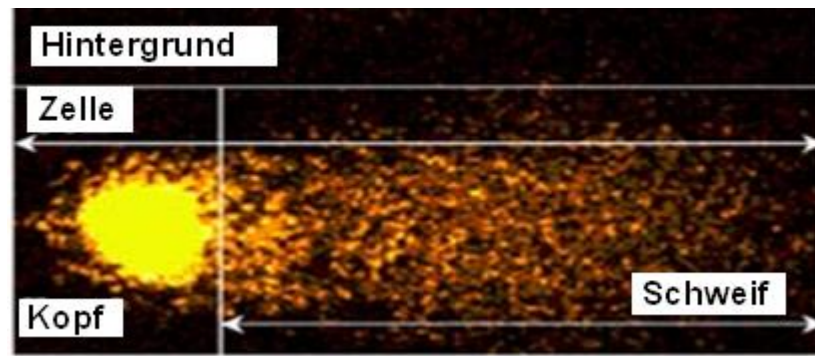


Abbildung 10: Darstellung der Ausmessung der Schweiflänge (Quelle: www.cometassayindia.org mit Bearbeitung)

2.2.4. Statistik

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur möglichen Zyto- und Gentoxizität von Zementen auf humane Lungenzellen werden nachfolgend im Kapitel 3 in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Diese Balken zeigen jeweils die errechneten Mittelwerte von je drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Die jeweiligen Standardabweichungen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel ermittelt. Des Weiteren wurde das Programm für die Berechnung der statistischen Signifikanz, für deren Nachweis der Student's t-Test herangezogen wurde, verwendet. Der Test wurde zweiseitig durchgeführt.

Der Vergleich der Mittelwerte der Proben erfolgte mit den Mittelwerten der Negativkontrollen. Zur besseren Veranschaulichung wurden auch die Referenzkontrollen in die Diagramme aufgenommen und auf die gleichen Werte bezogen. Der Grad der Signifikanz mit $p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$ wurde mit einem (*) bzw. zwei (**) Sternchen gekennzeichnet.

Die Ergebnisdarstellung des Cometassays erfolgte anhand des Parameters **Olive Tail Moment** (OTM), dies ist das Produkt aus der gewanderten DNA-Menge im Schweif (gemessen an Intensität) und Schweiflänge.

3 Ergebnisse

3.1 Zytotoxizität von Zementstäuben

Die Überprüfung der zytotoxischen Effekte von Zementen erfolgte mit Hilfe des WST-1-Farbstoffes, der die Funktion der mitochondrialen Reduktase in lebensfähigen Zellen aufzeigt.

Folgende Abbildungen (11-19) präsentieren die Zellvitalität von A549 nach Exposition mit DQ12, TiO₂, Zement A, Zement B, Zement C, Zement D, Klinker sowie Kalksteinmehl. Aus den Ergebnissen erkennt man deutlich, dass die metabolische Aktivität der A549-Epithelzellen unabhängig von der Konzentrationssteigerung der einwirkenden Zementstäube im Bereich von 80-100% liegt. Lediglich die höchste Konzentration von Kalksteinmehl zeigt eine geringe Aktivitätsherabsetzung auf 74%. Deutliche Toxizität zeigen die hohen Konzentrationen von Quarz mit $p = 0,014$ bei der Konzentration 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und mit $p = 0,016$ bei der Konzentration 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, wobei die Konzentrationen 50 und 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Zellvitalität von um die 100% aufweisen.

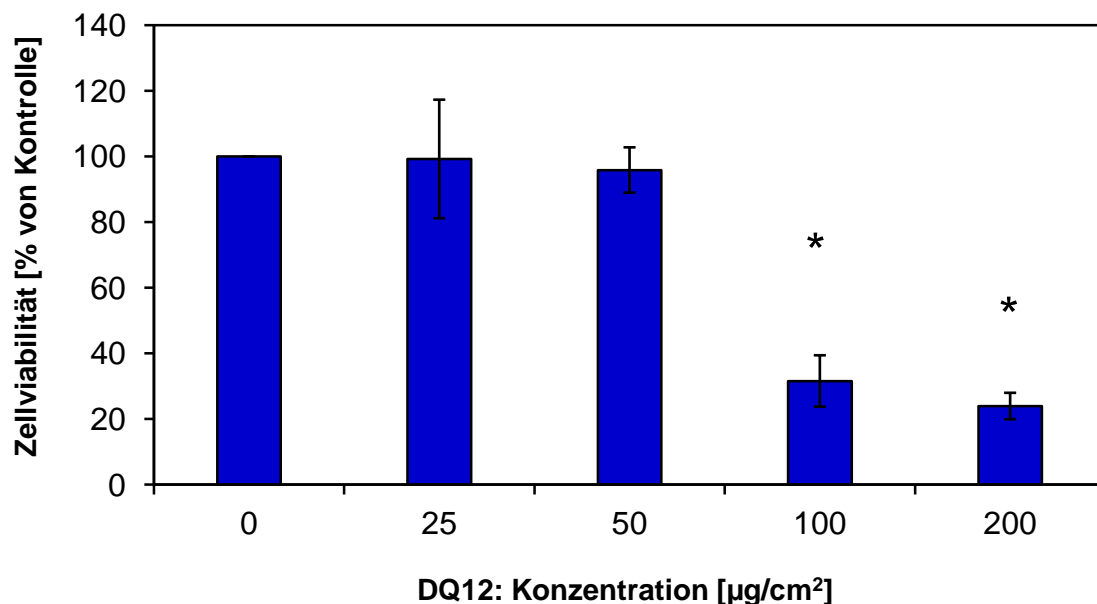


Abbildung 11: Darstellung der Zellviabilität der A549-Zellen in % in Relation zur Kontrolle, bestimmt mit Hilfe von WST-1 nach Inkubation über 4 Stunden mit DQ12 in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Alle Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar.

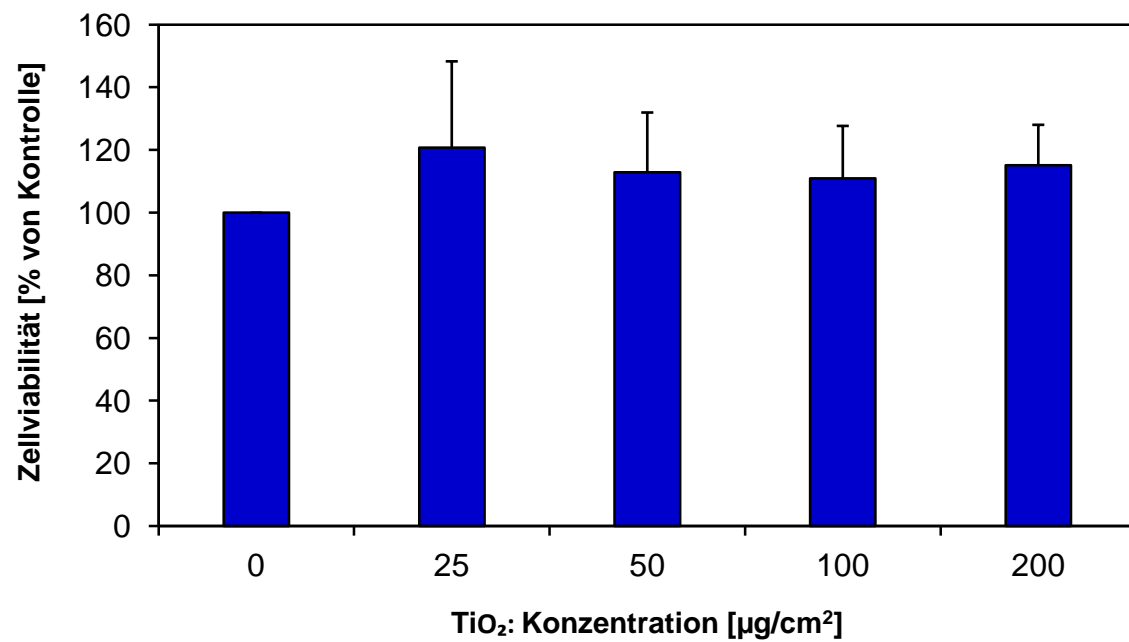


Abbildung 12: Darstellung der Zellviabilität der A549-Zellen in % in Relation zur Kontrolle, bestimmt mit Hilfe von WST-1 nach Inkubation über 4 Stunden mit TiO₂ in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200 µg/cm². Alle Werte stellen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar.

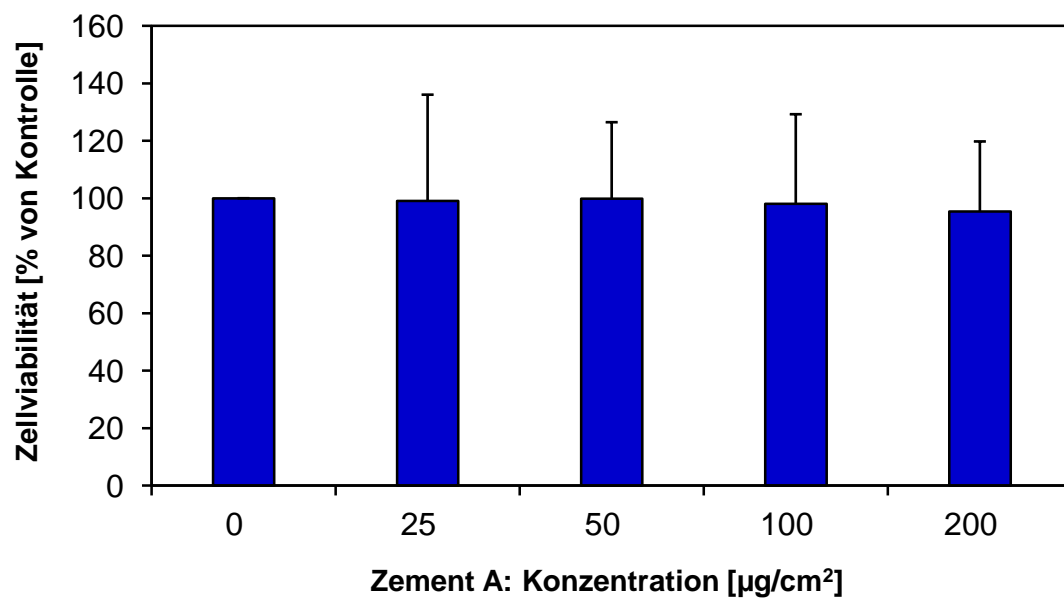


Abbildung 13: Darstellung der Zellviabilität der A549-Zellen in % in Relation zur Kontrolle, bestimmt mit Hilfe von WST-1 nach Inkubation über 4 Stunden mit Zementen A-Suspension in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200 µg/cm². Alle Werte stellen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar.

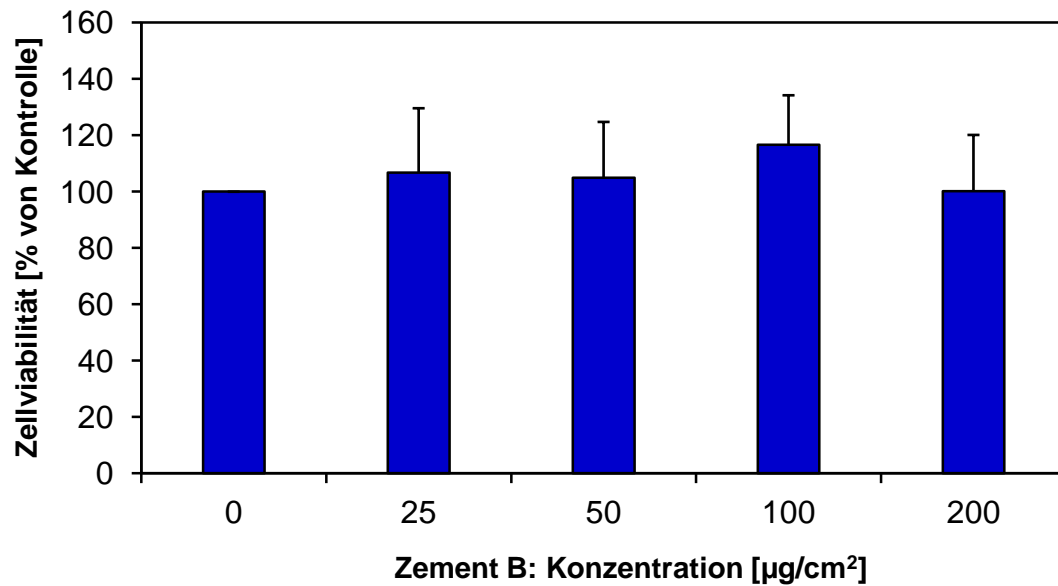


Abbildung 14: Darstellung der Zellviabilität der A549-Zellen in % in Relation zur Kontrolle, bestimmt mit Hilfe von WST-1 nach Inkubation über 4 Stunden mit Zement B-Suspension in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Alle Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar.

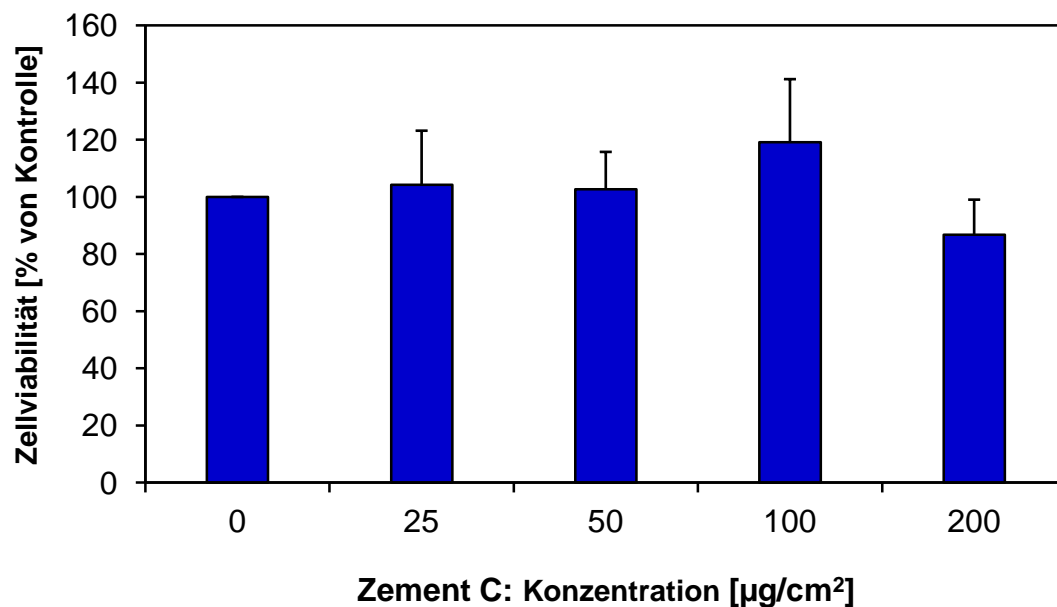


Abbildung 15: Darstellung der Zellviabilität der A549-Zellen in % in Relation zur Kontrolle, bestimmt mit Hilfe von WST-1 nach Inkubation über 4 Stunden mit Zement C-Suspension in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Alle Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar.

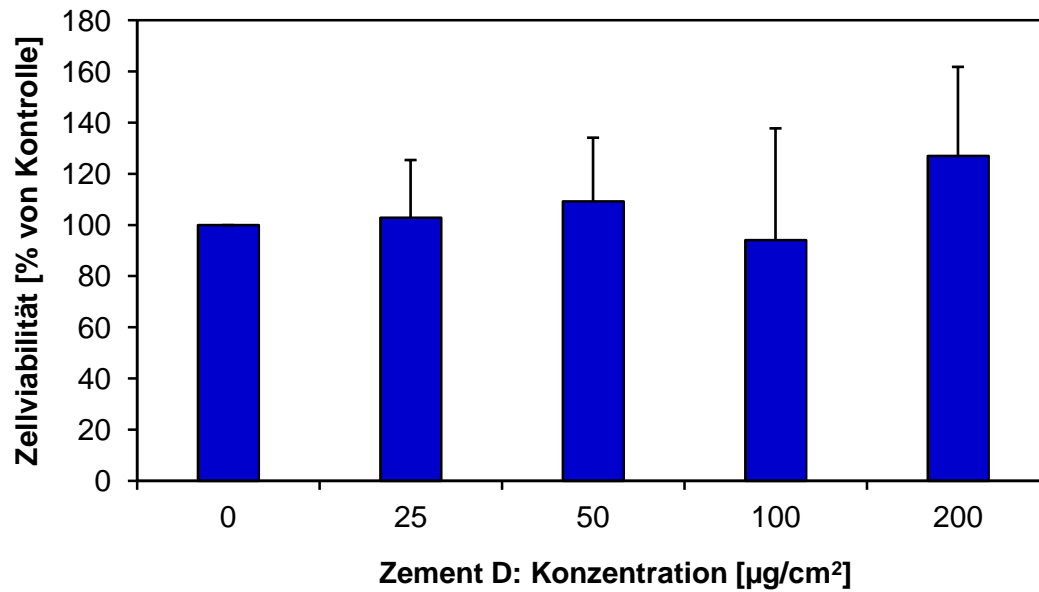


Abbildung 16: Darstellung der Zellviabilität der A549-Zellen in % in Relation zur Kontrolle, bestimmt mit Hilfe von WST-1 nach Inkubation über 4 Stunden mit Zement D-Suspension in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Alle Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar.

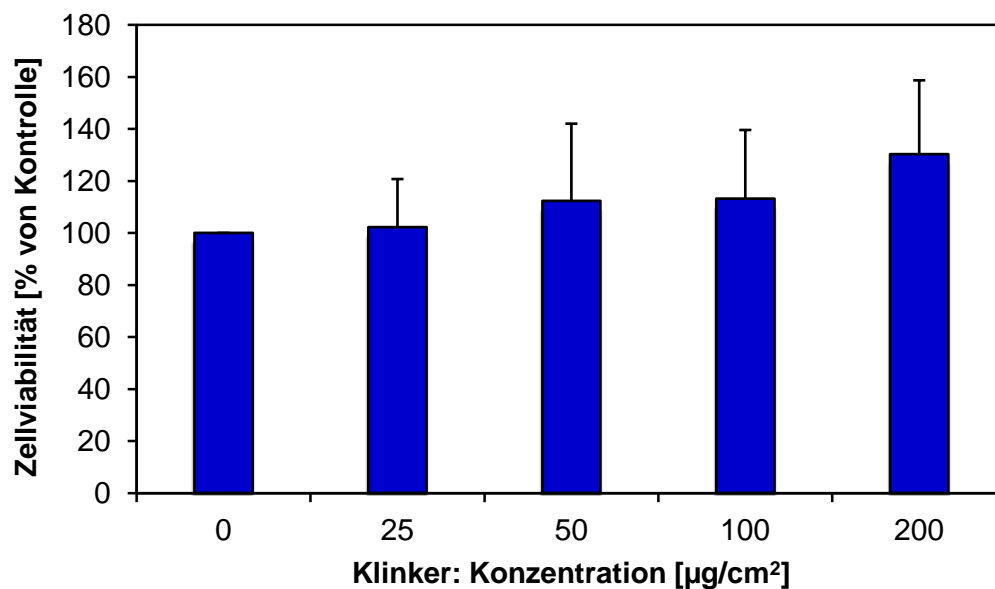


Abbildung 17: Darstellung der Zellviabilität der A549-Zellen in % in Relation zur Kontrolle, bestimmt mit Hilfe von WST-1 nach Inkubation über 4 Stunden mit Klinker in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Alle Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar.

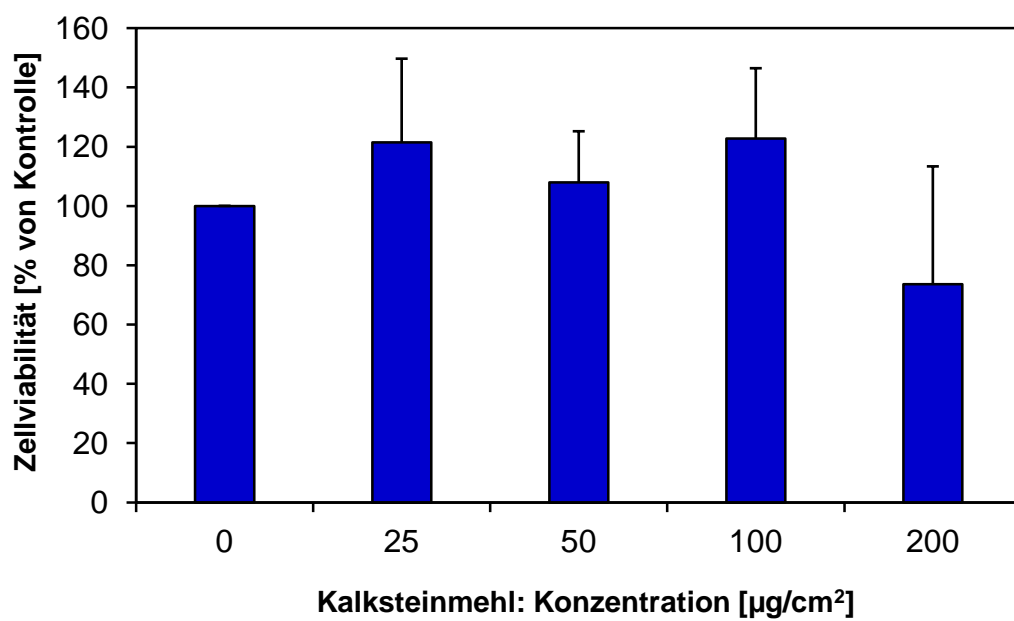


Abbildung 18: Darstellung der Zellviabilität der A549-Zellen in % in Relation zur Kontrolle, bestimmt mit Hilfe von WST-1 nach Inkubation über 4 Stunden mit Kalksteinmehl in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200 µg/cm². Alle Werte stellen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar.

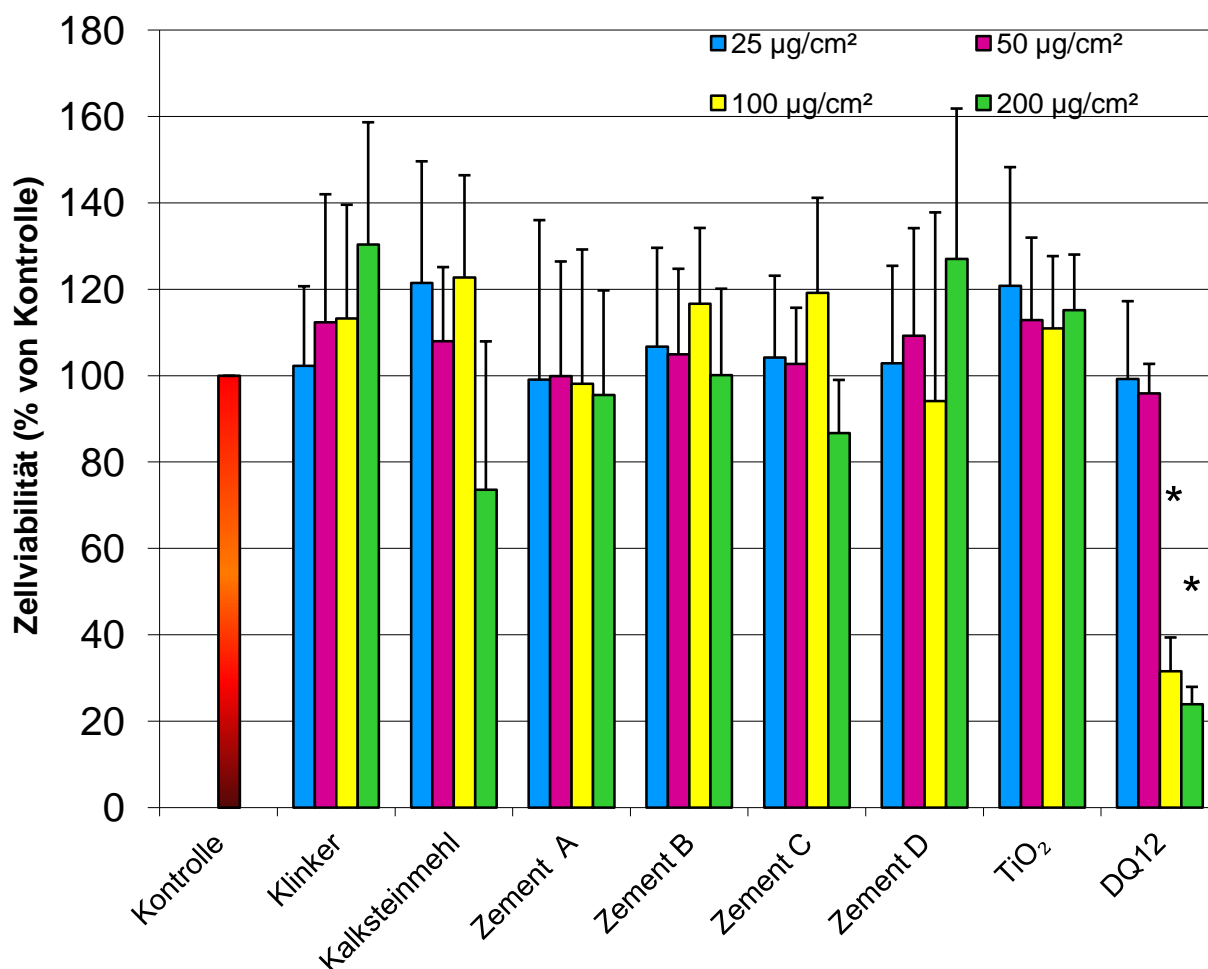


Abbildung 19: Darstellung aller Zellviabilitäten der A549-Zellen in % in Relation zur Kontrolle, bestimmt mit Hilfe von WST-1 nach Inkubation über 4 Stunden mit Zementen, Kalksteinmehl und Klinker sowie Positiv-Kontrolle DQ12 und Negativ-Kontrolle TiO₂ in Konzentrationen von 25, 50, 100 und 200 µg/cm². Alle Werte stellen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3) dar, (*p < 0,05)

Insgesamt können nach 4-stündiger Inkubation der Epithelzellen mit Stäuben keine signifikanten zytotoxischen Auswirkungen von den Zementen A, B, C und D sowie Klinker und Kalksteinmehl wie auch von der negativen Referenz Titaniumdioxid festgestellt werden. Hingegen führt die positive Kontrolle Quarz zu zytotoxischen Effekten.

3.2 Gentoxizität von Zementstäuben

(* = Titaniumdioxid ist mit Acridin-Orange gefärbt)

3.2.1 Gentoxische Effekte der Referenzen

3.2.1.1 H₂O₂

Im Folgenden ist die Darstellung der Konzentrations-Wirkungsgraphik der Positivkontrolle Wasserstoffperoxid aufgezeigt. Die Zellen wurden über 2 h gegenüber H₂O₂ exponiert, wobei alle getesteten Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der OTM-Werte im Vergleich zu der Lösungsmittelkontrolle HBSS erkennen lassen und zwar die Konzentration 25 µg/L mit $p=0,042$, die Konzentration 50 µg/L mit $p=0,038$ und die Konzentration 100 µg/L mit $p=0,017$.

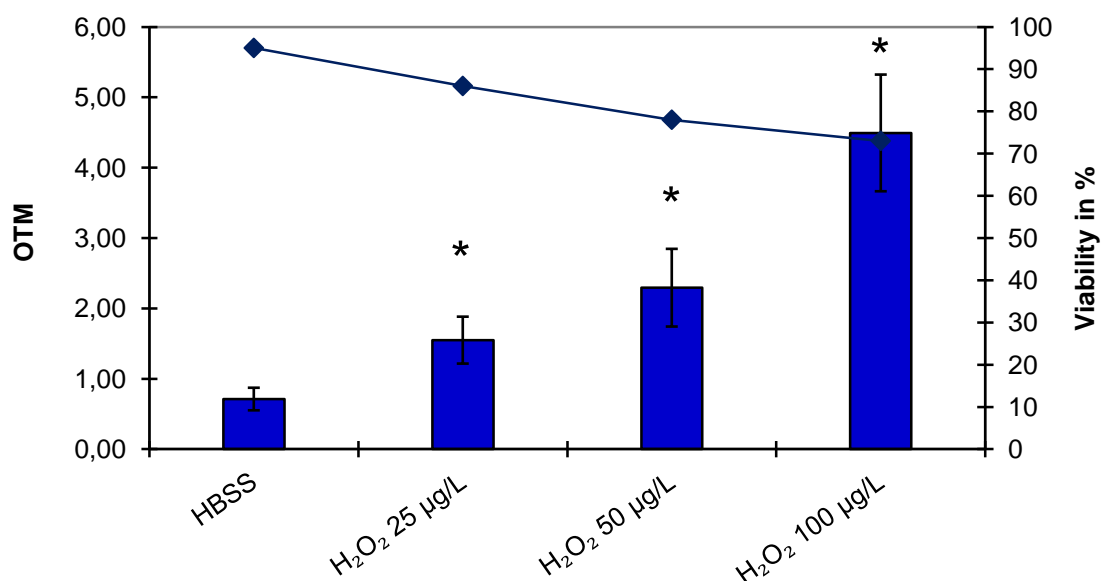


Abbildung 20: Darstellung der DNA-Migration (Balken) nach Exposition von A 549-Lungenzellen gegenüber 25, 50 und 100 µg/cm² H₂O₂ über 2 Stunden in Relation zu der Negativkontrolle HBSS. Weiterhin dargestellt die Zellviabilität. Die OTM- Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3), (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

3.2.1.2 DQ12

Folgende Abbildung zeigt die DNA-Wanderung (OTM) nach 4 stündiger Exposition der A549-Zellen mit Dörentruper-Quarzsuspension DQ12 in Relation zur positiven Kontrolle H_2O_2 und der Lösungsmittelkontrolle HBSS. Die Konzentrationen 50 und 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ weisen signifikante DNA-Migration ($p=0,007$ und $p=0,018$) bei ca. 75%iger Viabilität auf.

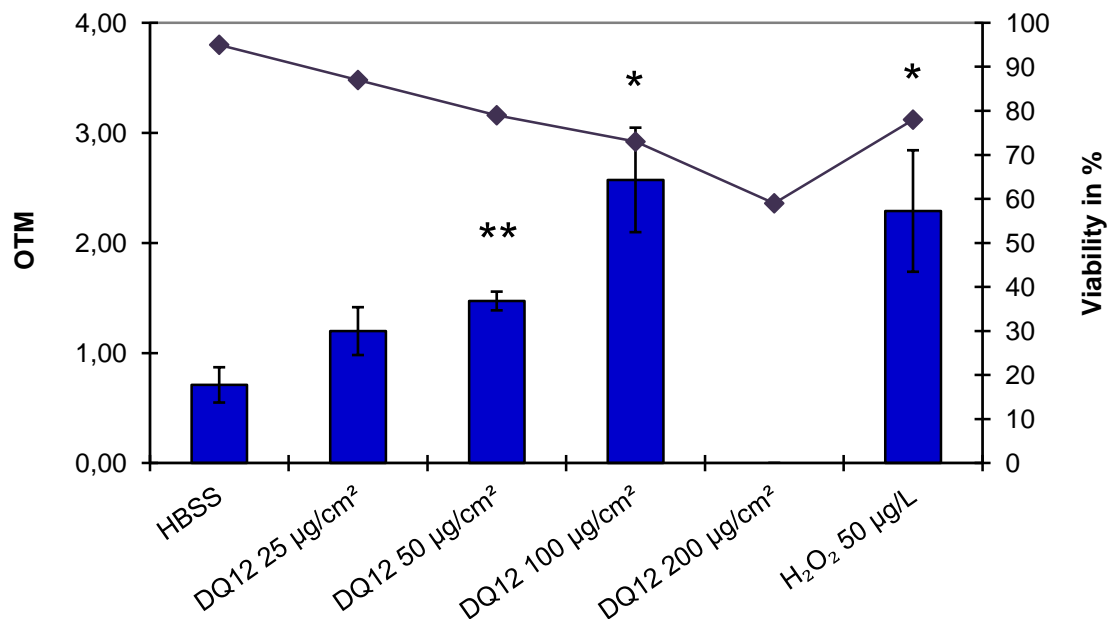


Abbildung 21: Darstellung der DNA-Migration (Balken) nach Exposition von A 549-Lungenzellen gegenüber 25, 50, 100 und 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ DQ12 über 4 Stunden in Relation zu der Positivkontrolle H_2O_2 sowie Negativkontrolle HBSS. Weiterhin dargestellt die Zellviabilität. Die OTM- Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen ($N=3$), (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Die höchste Konzentration von Quarz zeigte sich so stark zytotoxisch, dass kaum Zellen zu finden waren und bei vorhandenen Zellen aufgrund der Streuung im Schweiß keine Messung mehr möglich war.

3.2.1.3 TiO₂

Die Testung des Titandioxid erbringen keine OTM-Wert-Steigerung, sodass die Werte im Bereich der Lösungsmittelkontrolle HBSS schwanken.

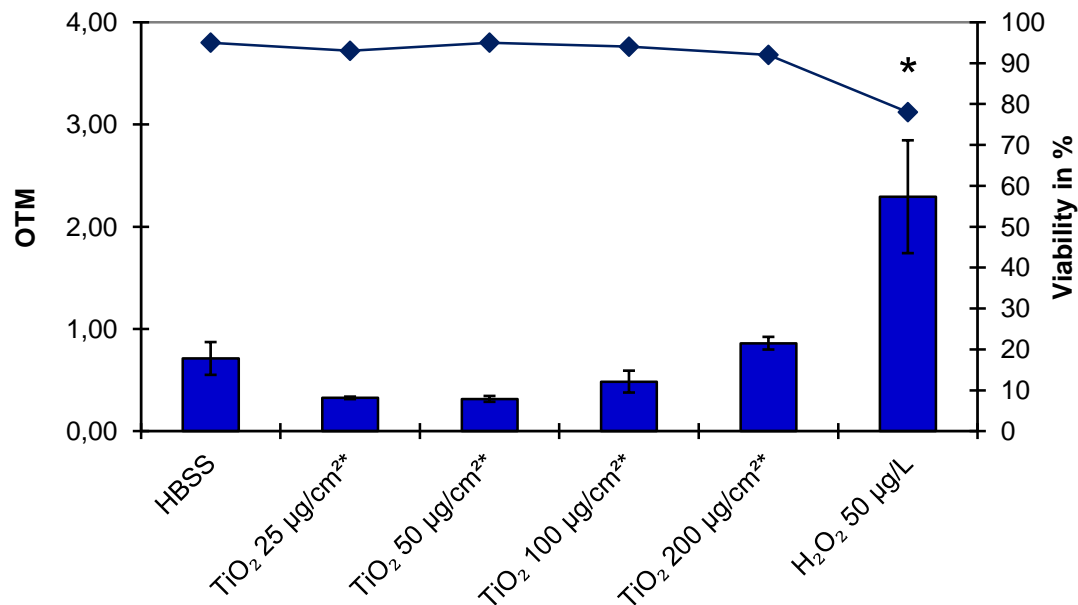


Abbildung 22: Darstellung der DNA-Migration (Balken) nach Exposition von A 549-Lungenzellen gegenüber 25, 50, 100 und 200 µg/cm² TiO₂ über 4 Stunden in Relation zu der Positivkontrolle H₂O₂ sowie Negativkontrolle HBSS. Weiterhin dargestellt die Zellviabilität. Die OTM- Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3), (*p < 0,05, **p < 0,01)

3.2.2 Gentoxische Effekte von Zementstäuben

Die Gentoxizität der einzelnen Zementstäube wurde mittels Comet-Assay überprüft. In den folgenden Abbildungen (19-24) sind die Ergebnisse zur Induktion von DNA-Migration in A549-Zellen durch Zementstäube A, B, C, D sowie Klinker und Kalksteinmehl in Relation zur Viabilität dargestellt. Die Zellen wurden für 4 h gegenüber den flüssigen Verdünnungen der Zementsuspension sowie gegenüber den positiven Kontrollen Quarz (DQ12) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und negativen Kontrollen Titandioxid (TiO₂) und HBSS exponiert.

3.2.2.1 Zement A

Der Zement A zeigt vor allem in den höheren Konzentrationen einen Anstieg an DNA-Schäden. Die DNA-Migration gemessen als OTM wird ab einer Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ im Vergleich zur HBSS- Kontrolle mit $p=0,028$ signifikant erhöht.

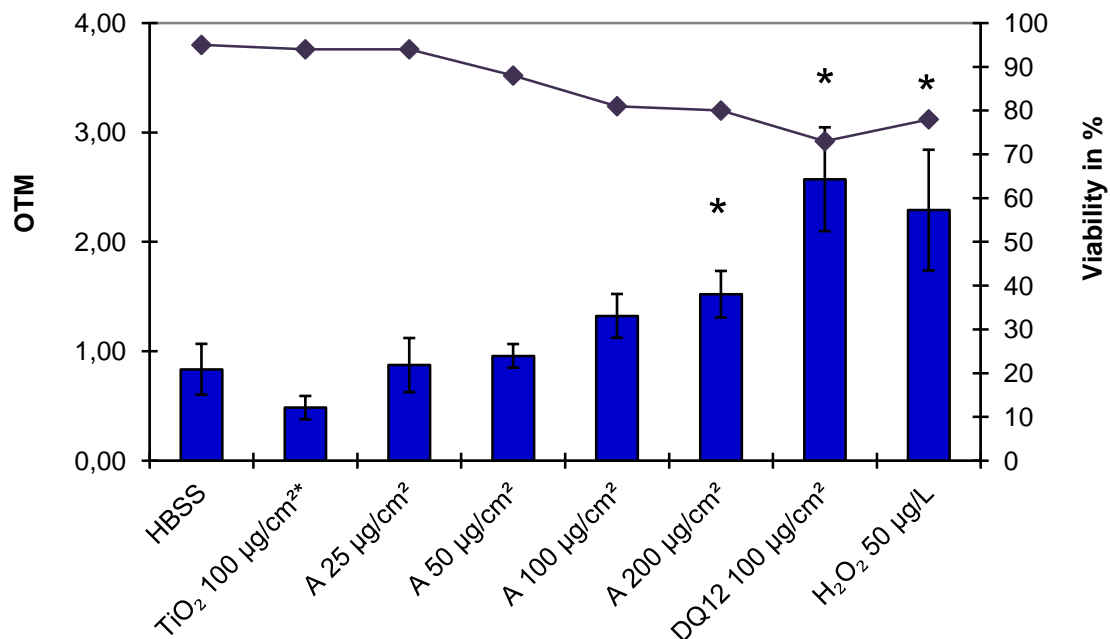


Abbildung 23: Darstellung der DNA-Migration (Balken) nach Exposition von A 549-Lungenzellen gegenüber 25-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Zement A über 4 Stunden in Relation zu den Positivkontrollen DQ12 und H₂O₂ sowie Negativkontrollen HBSS und TiO₂. Weiterhin dargestellt die Zellviabilität. Die OTM- Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3), (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Die niedrigeren Konzentrationen von 100, 50 und 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ zeigen eine gering konzentrationsabhängige nicht signifikante Erhöhung. Dagegen sind die positiven Kontrollen Quarz (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) mit $p=0,018$ und H₂O₂ (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) mit $p=0,038$ gegenüber der Kontrolle deutlich signifikant erhöht. Der OTM-Wert der maximal getesteten Konzentration des Zementes (200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) liegt bei $1,52 \pm 0,21$, dies entspricht dem 1,81fachen der Lösungsmittelkontrolle HBSS. Der Wert befindet sich jedoch um das 1,69fache unter dem Wert der Positivkontrolle Quarz DQ12 (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) und um das 2,95fache unter dem Wert von H₂O₂.

Der Erytrosin B-Test zeigt für die Verdünnungen der Zementsuspension und für Quarz DQ12 keine erkennbare Abnahme der Viabilität (75-100%).

3.2.2.2 Zement B

Bei der Exposition der Zellen mit dem Zement B erkennt man keine DNA-Migration in allen Konzentrationen. Alle Werte der Konzentrationsreihe entsprechen den Werten der Negativ-Kontrollen HBSS und TiO_2 und zeigen keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Negativkontrollen.

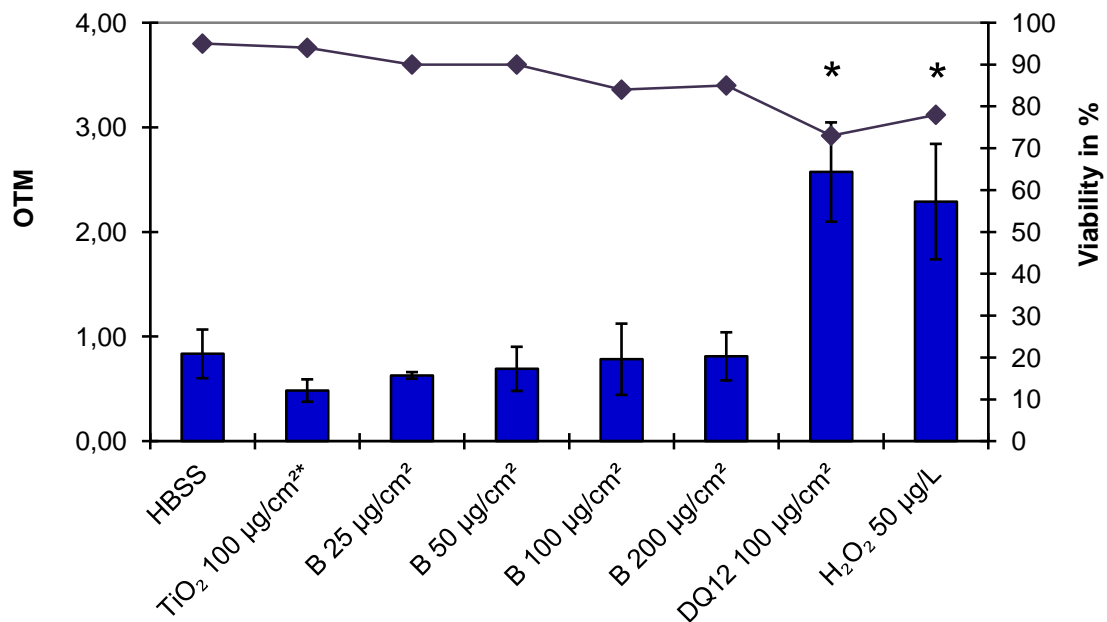


Abbildung 24: Darstellung der DNA-Migration (Balken) nach Exposition von A 549-Lungenzellen gegenüber 25-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Zement B über 4 Stunden in Relation zu den Positivkontrollen DQ12 und H_2O_2 sowie Negativkontrollen HBSS und TiO_2 . Weiterhin dargestellt die Zellviabilität. Die OTM -Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3), (*p < 0,05, **p < 0,01)

3.2.2.3 Zement C

Bei den Ergebnissen der Exposition mit dem Zement C liegen die OTM-Werte im Bereich von $0,56 \pm 0,04$ bis $0,75 \pm 0,06$. Es werden keine signifikanten Abweichungen von den Negativkontrollen beobachtet.

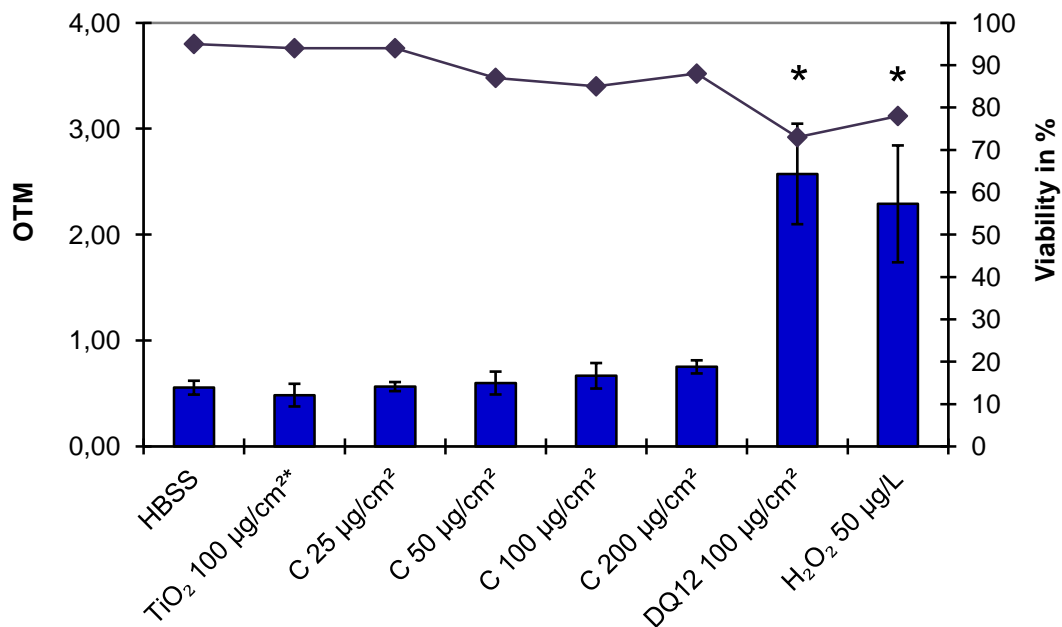


Abbildung 25: Darstellung der DNA-Migration (Balken) nach Exposition von A 549-Lungenzellen gegenüber 25-200 µg/cm² Zement C über 4 Stunden in Relation zu den Positivkontrollen DQ12 und H₂O₂ sowie Negativkontrollen HBSS und TiO₂. Weiterhin dargestellt die Zellviabilität. Die OTM- Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3), (*p < 0,05, **p < 0,01)

3.2.2.4 Zement D

Die OTM-Mittelwerte der geprüften Konzentrationen der Zementsuspension D zeigen keine konzentrationsabhängigen Erhöhungen und schwanken im Bereich von 0,63 und 0,77.

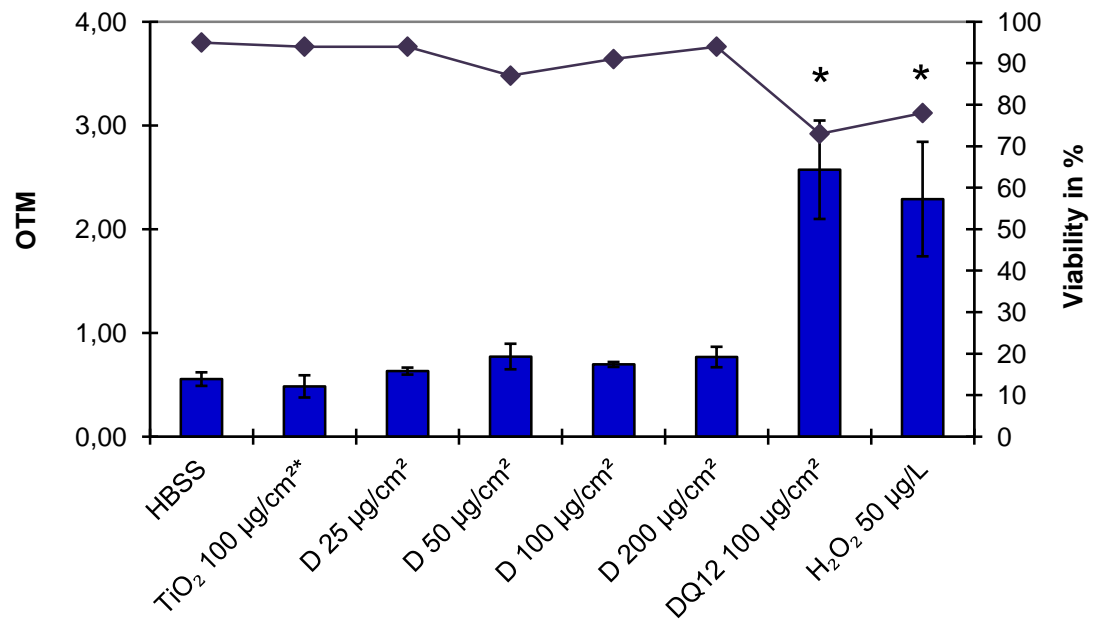


Abbildung 26: Darstellung der DNA-Migration (Balken) nach Exposition von A 549-Lungenzellen gegenüber 25-200 µg/cm² Zement D über 4 Stunden in Relation zu den Positivkontrollen DQ12 und H₂O₂ sowie Negativkontrollen HBSS und TiO₂. Weiterhin dargestellt die Zellviabilität. Die OTM- Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3), (*p < 0,05, **p < 0,01)

3.2.2.5 Klinker

Beim Klinker beobachtet man keine Induktion der DNA-Migration, sondern nur Schwankungen der OTM-Werte im Bereich von 0,72-0,76, wobei keine Konzentrationsabhängigkeit zu sehen ist. Alle Werte liegen im Bereich der Schwankungen der negativen Referenzen und sind mit einem großen Abstand von den Positivkontrollen entfernt.

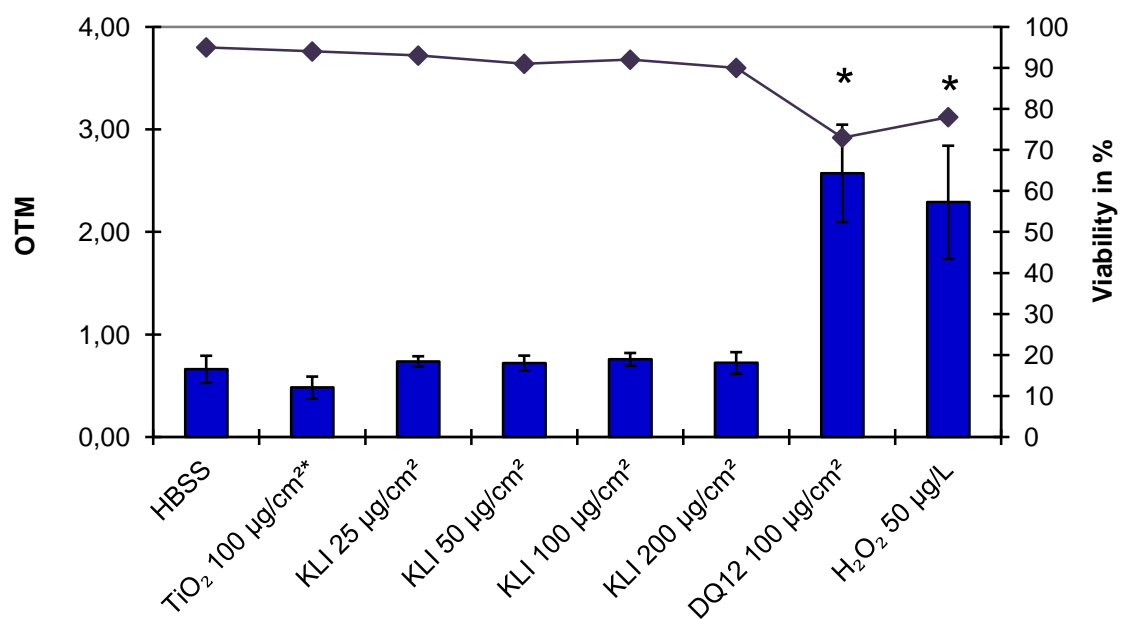


Abbildung 27: Darstellung der DNA-Migration (Balken) nach Exposition von A 549-Lungenzellen gegenüber 25-200 µg/cm² Klinker über 4 Stunden in Relation zu den Positivkontrollen DQ12 und H₂O₂ sowie Negativkontrollen HBSS und TiO₂. Weiterhin dargestellt die Zellviabilität. Die OTM- Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3), (*p < 0,05, **p < 0,01)

3.2.2.6 Kalksteinmehl

Kalksteinmehl lässt ebenfalls keinen konzentrationsabhängigen Anstieg der OTM-Werte erkennen, wobei der Wert der niedrigsten Konzentration bei $0,68 \pm 0,08$ und bei $0,84 \pm 0,06$ für die höchste Konzentration liegt. Alle Werte sind nicht signifikant und sind um das 3–3,8fache unter der Positivkontrolle Quarz.

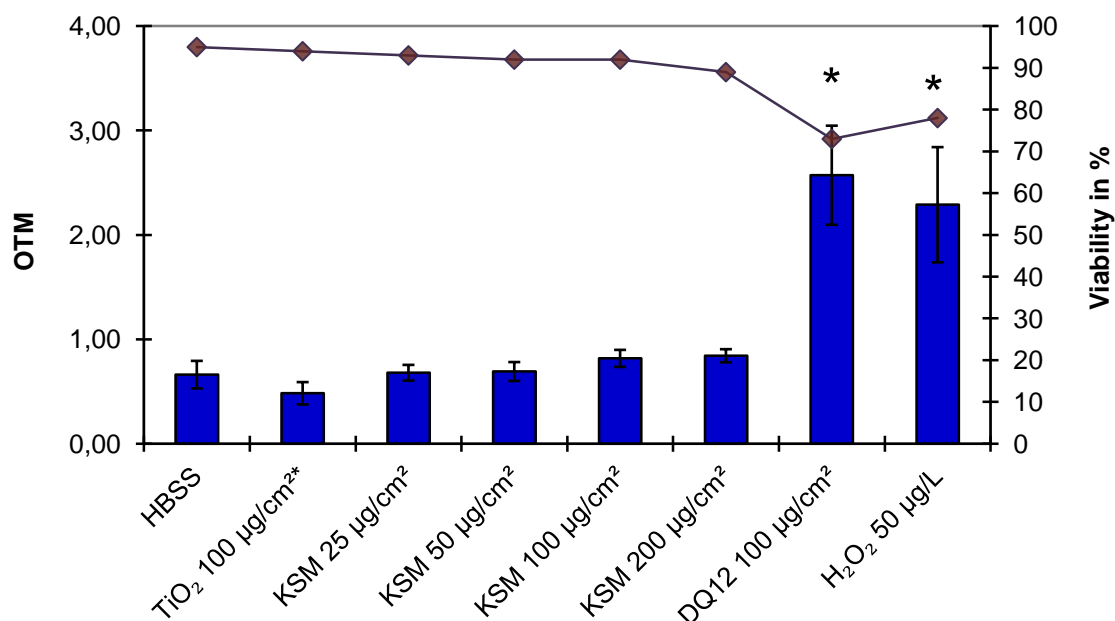


Abbildung 28: Darstellung der DNA-Migration (Balken) nach Exposition von A 549-Lungenzellen gegenüber 25-200 µg/cm² Kalksteinmehl über 4 Stunden in Relation zu den Positivkontrollen DQ12 und H₂O₂ sowie Negativkontrollen HBSS und TiO₂. Weiterhin dargestellt die Zellviabilität. Die OTM Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (N=3), (*p < 0,05, **p < 0,01)

3.2.2.7 Zusammenfassende Betrachtung

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei der Prüfung der Suspensionen der Zemente A, B, C, D sowie von Klinker und Kalksteinmehl auf DNA-Schäden im Comet-Assay keine der geprüften Proben eine lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung aufwies. Lediglich die Suspension des Zementes A zeigte bei der höchsten geprüften Konzentration eine signifikante DNA-Migration, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß als die Positivkontrolle Quarz DQ12. Alle anderen Zemente, Klinker und Kalksteinmehl befanden sich im Schwankungsbereich der

Lösungsmittelkontrolle HBSS und lieferten damit keinerlei Hinweise auf einen gentoxischen Effekt der Testsubstanzen.

4 Diskussion

Viele Studien beschäftigen sich mit den Auswirkungen der inhalierbaren Partikel auf den menschlichen Organismus und versuchen vor allem die Mechanismen, die zur Entstehung von Krankheiten führen, zu klären.

Mittlerweile gibt es viele partikuläre Stoffe, die oft genug untersucht wurden, um als Modellpartikel zu gelten. Für Dörentruer Quarz wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen eine entzündungsfördernde sowie eine karzinogene Wirkung nachgewiesen (Borm et.al., 2000, Albrecht et.al., 2004).

Auch Titaniumdioxid hat das jahrelange Interesse auf seiner Seite und wurde erst als unbedenklich eingestuft, wobei die neusten Studien einen anderen Trend aufdecken und viel differenzierter an diese Substanz herangehen (Donaldson et al., 2001; Oberdörster et al., 2005 in Wahrheit et al., 2006).

Diese beiden Substanzen finden in dieser Arbeit ihren Einsatz als Referenzpartikel.

4.1 Referenzen

4.1.1 Wirkmechanismus von Quarz

Quarz wurde in dieser Studie als Positivkontrolle eingesetzt, um vor allem die Wirkmechanismen von zu untersuchenden partikulären Proben vergleichen zu können. Quarz ist ein Mineral, das überall in der Natur vorkommt. Der Dörentruer Kaolinit Sand (DQ12) mit einem Siliziumdioxidgehalt von über 90 %, welcher hier zum Einsatz kommt, ist als Standardquarz etabliert und spielt vor allem in der Lungenkrebsforschung eine große Rolle. Die Größe der Partikel ist bei $<5\ \mu\text{m}$ anzusiedeln, weswegen die Partikel in der Lage sind die Zellmembran zu passieren.

Siliziumdioxid ist das zweithäufigste Mineral der Erde und aus der Industriewelt nicht wegzudenken. Quarz findet seine Verwendung in der Zement-, Keramik-, Glas-, Schmuckindustrie, chemischen Industrie und vielen mehr. Bei seiner Verarbeitung und

Förderung kommt es zur Entstehung von feinstem Quarzstaub, wobei die Exposition gegenüber diesem als gesundheitsgefährdend einzustufen ist.

Seit den 90 Jahren ist Quarz als ein Karzinogen weltweit bekannt. Dazu trugen in vivo Untersuchungen, die den Zusammenhang der Quarzexposition mit der Entstehung von Tumoren in peripheren Lungenzellen von Ratten aufzeigten (Johnson et al., 1987, Hext et al., 1994, Fubini et.al., 2003), wobei die Karzinogenese und die Mechanismen, die dazu führen, noch nicht gänzlich geklärt sind.

Ein möglicher Entstehungsweg von Tumoren scheint über eine chronische Entzündung zu laufen. Die Entzündungsreaktionen wurden in vivo an Rattenlungen und in vitro beobachtet, dabei wird Quarz von Makrophagen, die zum Abwehrsystem der Lunge gehören, aufgenommen. Dieser Vorgang induziert eine Freisetzung von Inflammediatoren. Die produzierten NT- κ B und TNF- α sind nur ein paar Marker für eine akute Entzündung oder eine kontinuierliche Inflammation, wobei die Entzündungsreaktion wie z. B. die Proliferation von Entzündungszellen, gemessen anhand eines Anstieges der Gesamtzellzahl (bestehend hauptsächlich aus Alveolarmakrophagen und Neutrophilen) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) ab einer eingeblösten Quarzdosis von 2 mg hervorgerufen wird. Folgend führen vor allem die chronischen Vorgänge zur Vermehrung von Bindegewebe und damit zur Fibrose, was wiederum eine Entstehung von Tumoren begünstigt. (Albrecht et al., 2004)

Ein weiterer Mechanismus, der zur Entstehung eines Tumors beiträgt, ist das Hervorrufen von DNA-Schäden. Dieses kommt zustande durch reaktive oxygene Spezies (ROS), die durch Quarzeinwirkung entstehen.

Schins et al. (2002) zeigten unter anderem die wichtige Rolle von Hydroxylradikalen, die durch Sauerstoffreduktion in wässrigen Medien unter Anwesenheit von Quarz gebildet werden, auf. Die Radikale führen durch ihr Angreifen an der DNA zu Strangbrüchen. Diese Effekte korrelieren mit der bekannten Genotoxizität von Wasserstoffperoxid. Des Weiteren wies die Arbeitsgruppe die Generierung von 8-Hydroxydeoxyguaninen (8-OHdG) bei der Exposition der RLE-Zellen (immortalisierte alveoläre Epithelzellen der Rattenlunge) und der alveolären Epithelzellen der humanen Stammzellreihe A549 nach. Die DNA-Schäden, die mit dem Auftreten von 8-OHdG sichtbar werden und als Indikator für oxidative DNA-Schäden gelten, werden als Verursacher von Veränderungen in krebserzeugenden Genen gesehen (Floyd, 1990, Kasai und Nishimura, 1991).

Anderen Untersuchungen zur Folge liegt der Verdacht nahe, dass die Genotoxizität von Quarz im engen Zusammenhang mit der Zytotoxizität steht. Çakmak et al. (2004) verglichen mittels SCGE die Genotoxizität und mittels MTT und LDH-Tests die Zytotoxizität von unterschiedlichen Quarzproben in Alveolarzellen und beobachteten, dass bei hohen Konzentrationen sowohl die zytotoxischen, wie auch die genotoxischen Effekte sich signifikant zeigten, bei niedrigen Konzentrationen jedoch bei hoher Zellviabilität auch keine Genotoxizität sich mehr nachweisen ließ.

Knaapen et al. (2002) machten außerdem auf die Oberfläche von Quarzteilchen aufmerksam. Dabei wurden Ratten mit Quarz exponiert, dessen Oberfläche mit Polyvinylpyridin-N-Oxid (PVNO) und Aluminiumlaktat (AL) beschichtet wurde. Die Inkubation der Lungenzellen mit behandelter Oberfläche führten zu keinen DNA-Schäden, wohingegen die unbehandelten Quarzoberflächen eine signifikante Steigerung dieser verursachten. Beide behandelten Oberflächen verhindern die Induktion von Entzündungsprozessen und somit die Veränderungen an der DNA. Dies lieferte den Beweis für die Wichtigkeit der Oberflächenbeschaffung für die Genotoxizität von Quarz.

Neben den Mechanismen, die über Entzündungsreaktionen zur Tumorentstehung beitragen, werden auch Tumorursachen anderer Genese diskutiert. Es deutet sich an, dass bei Rauchern mit Quarzexposition ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs besteht. So lagen Überlegungen nahe, dass bestimmte Enzyme wie P450 1A1 (= CYP1A1), die in die Kanzerogenese des Rauchens eingebunden sind, auch von Quarz beeinflusst werden können. CYP1A1 spielt eine große Rolle bei der Umwandlung von polycyclischen Aromaten, wie z.B. Benzo(a)pyren aus Zigarettenrauch in krebserzeugende Epoxide. Die Hypothese konnte unterstützt werden, indem man in vitro in Rattenlungenzellen nach Quarzexposition eine dosis-abhängige Induktion von CYP1A1-mRNA und in vivo eine Erhöhung der Expression des Aryl-Hydrokarbon-Rezeptors beobachtet hat und zum Entschluss kam, dass die Effekte von Quarz als kokarzinogen gesehen werden können. (Becker et al., 2006)

Insgesamt betrachtet, lässt sich sagen, dass die Effekte von Quarz und vor allem die Mechanismen, die für die Genotoxizität verantwortlich sind, auch nach zahlreichen Studien noch nicht bis ins kleinste Detail geklärt sind. Fest steht jedoch, dass toxische Wirkungen von Quarz belegt und vor allem auf die gesteigerte Produktion von Sauerstoffspezies und damit auf die Erzeugung von oxidativen Stress zurückzuführen sind. Sowohl Entzündungsreaktionen mit Steigerung des TNF- α und des

Transkriptionsfaktors NT- κ B und damit mit Steigerung der Makrophagen- und Neutrophilenproliferation (Albrecht et al., 2004) wie auch erhöhte Expression bestimmter Enzyme z.B. P450 1A1 (Becker et al., 2006) spielen bei der Tumorentstehung nach Quarzexposition eine wichtige Rolle.

4.1.2 Wirkmechanismus von TiO_2

Seit vielen Jahren wird Titaniumdioxid als Modellpartikel für negative Referenz bei vielen Untersuchungen zur Staubexposition herangezogen.

Es kommt in der Natur als natürliches Mineral in unterschiedlicher kristallinen Struktur wie Ilmenit, Anatase und Rutile vor. Am häufigsten wird es jedoch industriell hergestellt und vielen Kosmetikprodukten und Lebensmitteln beigelegt. Zudem ist es ein Bestandteil von Pharmaka und bildet bis zu 70% des Gehaltes von Farben, womit es für die Farbstoffproduktion existenziell wichtig wird. Titaniumdioxid kann feinpartikulär ($>0,2 \mu\text{m}$ im Durchmesser) sowie ultra-feinpartikulär, definitionsgemäß $<100 \text{ nm}$ vorkommen bzw. hergestellt werden. Lange Zeit galt TiO_2 als inert und gesundheitsunschädlich, doch die neusten Studien zeigen eine deutlich andere Tendenz an. (monograph iarc)

Seit der in die öffentliche Diskussion kommenden Nanotechnologie stehen die ultrafeinen Titaniumdioxid-Partikel unter Beobachtung. In vivo Studien an Ratten erbrachten einige Hinweise, dass ultrafeine Partikel eine stärkere Entzündungsantwort induzierten, als die dazu verglichenen größeren Teilchen (Donaldson et al., 2001, Oberdörster et al., 2005, Wahrheit et al., 2006). Auch andere Untersuchungen zur Toxizität von Nanopartikeln neben feinen Carbon black- und TiO_2 -Partikeln auf Lungen in Ratten und Mäusen zeigten ähnliche Ergebnisse und demonstrierten ein höheres inflammatorisches Potenzial der kleineren, als das der größeren Teilchen (Bermudez et al., 2004, Wahrheit et al. 2006). Zum einen wird dabei mehr der Größe, zum anderen der spezifischen Oberflächenbeschaffung der ultrafeinen Partikel ($\text{PM} < 100 \text{ nm.}$) eine wichtigere Rolle bei der Erklärung der Ergebnisse zugesprochen, als der Bedeutung von unterschiedlichen Konzentrationen der instillierten Substanz (Donaldson et al., 2001; Oberdörster et al., 2005, Wahrheit et al., 2006). Sogar bei einer Überladung an Schwebepartikeln von 23 mg/m^3 zeigte sich eine höhere Entzündungsreaktion durch ultrafeine Partikel als durch feine Partikel (PM_{10}) (Ferin et. al. in Donaldson et. al. 2001).

Am meisten reagierten Ratten, weniger Mäuse und Hamster mit chronischen Entzündungsantworten, Proliferation von Bindegewebe und Tumorentwicklung auf subchronische Einwirkung von hohen Konzentrationen von Titaniumdioxidpartikeln (Bermudez et al., 2002).

Im Gegensatz dazu fand die Arbeitsgruppe von Warheit (2006) keinen signifikanten Unterschied bei der Toxizität der ultrafeinen Partikel nach Exposition der Rattenlungen im Vergleich zum feinen Titaniumdioxid. Es ließen sich vorübergehende Entzündungsreaktionen und Zellschädigungen detektieren, die in gleicher Weise bei den größeren TiO_2 -Partikeln sichtbar waren. Diese geringen pulmonalen Effekte reichen auf keinen Fall an die starken toxischen Wirkungen von Quarz im Sinne einer chronischen inflammatorischen Reaktion, ausgelöst durch Makrophagen-Aktivierung mit Entwicklung von Fibrose, heran. Auch die große Bedeutung, die in anderen Studien (Donaldson et al., 2001; Oberdörster et al., 2005) der größeren messbaren Oberfläche der kleineren Partikeln verglichen mit den größeren Partikeln bei gleicher chemischer Zusammensetzung beigemessen und postuliert wurde, konnte seinerseits nicht nachvollzogen werden.

Eine andere Studie zeigte, dass bei Belastung der Lungen von Ratten mit Konzentrationen, die die Lungenclearance weit überschreiten, bekannt inerte Stäube toxische Effekte auslösen können. Beide Partikelgrößen (feine und ultrafeine Partikel) induzierten gleichermaßen Tumoren bei der chronischen Überladung der Lunge mit inhalierbarem Staub. (Heinrich et al., 1995; Lee et al., 1985 in Wahrheit et al., 2006). Andere Effekte, die man anhand der unterschiedlichen Tumor-Formationen beim feinen und ultrafeinen Titaniumdioxid, obwohl die Entzündungsreaktionen gleich waren, erfasst hat, konnten als direkte Einwirkung von ultrafeinem TiO_2 interpretiert werden (Borm, 2000).

Diese kontroversen Meinungen veranlassten die IARC das Titaniumdioxid 2006 als ein mögliches Karzinogen in die Gruppe 2B einzustufen.

Zusammenfassend betrachtet, scheint es, dass *ultrafeiner* TiO_2 nicht mehr so ohne Weiteres als Negativkontrolle eingesetzt werden kann. Es verursacht in in vivo Studien eine deutliche akute, wie auch chronische Inflammation und in manchen Fällen sogar eine Tumorinduktion, wobei nur ansatzweise diskutiert wurde, welchen Einfluss dabei die Oberfläche der Teilchen ausübt. *Feiner* TiO_2 jedoch macht viel geringere Effekte wie

z. B. kurzfristige Inflammationsantworten nach intratrachealer Einflößung von 5 mg/kg bei Ratten (Wahrheit et al., 2006).

4.2.3 Bewertung eigener Ergebnisse

Die Testreihen zu den verwendeten Positivkontrollen erbrachten eindeutige Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für Quarz und Wasserstoffperoxid.

Beim DQ12 beobachtete man ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ einen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhten Wert und damit eine gentoxische Wirkung auf die A549-Lungenzellen. Dieses stimmt mit den Beobachtungen von Schins et al (2002) überein. Die Zytovitalität lag bei dieser Konzentration bei 79% und konnte als Ursache für die DNA-Migration ausgeschlossen werden. Bei der Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ war der durchschnittliche Absolutwert von OTM mit 2,57 noch höher als der getesteten Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, die Signifikanz jedoch mit $p = 0,018$ gegenüber $p = 0,007$ niedriger, aufgrund der größeren Schwankungen der Werte. Die Zellvitalität bestimmt mit Hilfe des Erytrosin B-Assays lag im Vergleich zu den Ergebnissen aus der Studie Schins im niedrigeren Bereich bei 73%, wobei jedoch beim WST-1-Assay eine etwas noch niedrigere Zellviabilität gesehen wurde, und die höchste getestete Konzentration des Quarzes von 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ erwies sich in beiden Zytotoxizität-Assays sogar als extrem toxisch, so dass keine Zellen zu finden und auszuwerten waren. Da in einigen Publikationen 70%ige Zytovitalität als ausreichend akzeptiert wird, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen (Storer et al., 1996), wurde in dieser Arbeit die 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ -Konzentration von Quarz mit der Zellvitalität von 73% als positive Referenz für weitere Darstellung und weitere Vergleiche festgesetzt.

Für H_2O_2 wurde ebenfalls eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit vorgetestet. Die Werte zeigten ähnliches signifikantes Verhalten wie die des Quarzes, sowohl für Gentoxizität in etwas höherem Bereich mit OTM-Werten von 2,29 (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) und 4,49 (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$), wie auch für die Zytotoxizität im gleichen Bereich mit 78% (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) und 73% (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$). Bei der Konzentration von 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ konnte eine deutliche Toxizität auf die Lungenzellen beobachtet werden.

Titaniumdioxid bereitete bei den Vortests die meisten Schwierigkeiten. Bei allen Versuchen wurden Staubsuspensionen angewendet, die auf Alveolarzellen aufgetragen wurden. Beim Abwaschen konnte keine vollständige Entfernung der Stäube erreicht werden. Bei der Durchführung des Comet-Assays wurde für die Auswertung von TiO_2 -

behandelten Lungenzellen die Färbung mit Ethidiumbromid ausprobiert. Es zeigte sich eine starke Eigenfluoreszenz der Partikel (Karlson, 2010) bei diesen Zellen, sodass das Ausmessen der Zellen sich schwierig gestaltete.



Abbildung 29: A549-Zelle nach Exposition mit Titandioxid (200 µg) und nach Anfärben mit Ethidiumbromid

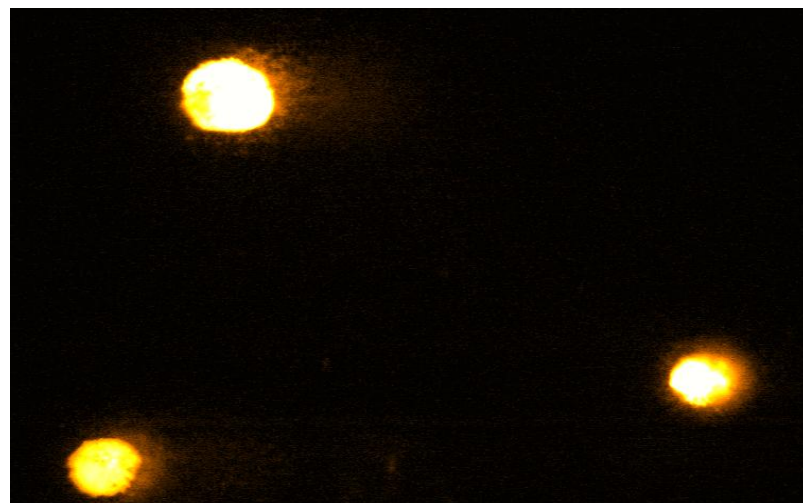


Abbildung 30: A549-Zellen nach Exposition mit Titandioxid (100 µg) und nach Anfärben mit Ethidiumbromid

Aus diesem Grund erfolgte die Färbung mit Acridinorange (= *). Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte die Auswertung ausgeführt, TiO_2 als nicht gen- oder zytotoxisch erkannt und als negative Kontrolle eingesetzt werden.

4.2 Zemente

4.2.1 Bisherige Daten zur Toxizität von Zementen

Zement ist eine Substanz, die aus gemahlenen, anorganischen und nichtmetallischen Bestandteilen zusammengesetzt ist. Er besitzt die Fähigkeit in Verbindung mit Wasser zu erhärten und lässt sich danach auch nicht wieder auflösen. Den Hauptbestandteil der chemischen Zusammensetzung des Zementes bilden die kiesel-sauren Calciumsalze sowie Aluminium-, Eisen- und Sulfatanteile. Seine Hauptaufgabe liegt darin Mörtel und Beton zu verbinden, zwei Bausubstanzen, die mit Hilfe von Hydratationsreaktionen zu ihrer dauerhaften Festigkeit gelangen, die gegenüber den Umwelteinflüssen standhaft bleibt.

Die Herstellung des Portlandzementes erfolgt großindustriell aus Kalkstein, Sand, Ton und Eisenerz. Durch Zuführen von weiteren Bestandteilen wie Hüttensand, Puzzolan, Flugasche und Kalkstein resultieren Zemente mit verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften. (www.vdz-online.de)

Da Zement zu den meistverwendeten Baumaterialien gehört, wecken die möglichen Risiken und Gefahren bei seiner Herstellung und Verwendung das Interesse von Arbeitsmedizinern und Umweltinstituten. Neben den bereits länger bekannten Krankheiten wie z.B. Zementekzeme (ca. 300 Fälle/Jahr) (www.lubw.baden-wuerttemberg.de) oder obstruktive Atemwegserkrankungen (ca. 800 Fälle/2011 als Berufskrankheit anerkannt) (DGUV-Statistiken für die Praxis 2011) wird die Aufmerksamkeit immer mehr auf weitere, vor allem durch Inhalation von Zementstäuben induzierbaren Krankheiten gelenkt. Demnach werden neben chemisch-irritativen Effekten auch karzinogene Effekte auf den respiratorischen Trakt mit der Folge von z.B. Larynx-Karzinom in einigen epidemiologischen Studien behandelt und diskutiert. (Dietz et al., 2004).

Es zeigte sich 1998 in Untersuchungen von äthiopischen Fabrikarbeitern, die drei unterschiedlichen berufsspezifischen Stäuben, entstanden bei Zement-, Garn- und Tabakherstellung, ausgesetzt waren, dass staubexponierte Personen höhere

Erkrankungshäufigkeit an chronischem Husten, chronischer Bronchitis und an Asthma bronchiale, als die Kontrollgruppe aufwiesen, wobei die Effekte bei Zementstaub- und Baumwollstaubexposition ein höheres Signifikanzniveau mit $p = <0,001$ zeigten, im Gegensatz zu den mit Tabakstaub exponierten Arbeitern ($p = <0,05$). Das Rauchen, als bekannter Risikofaktor für Lungenkrankheiten wurde hierbei ausgeschlossen (Mengesha et al., 1998).

Eine Studie von Al-Neiami et al. (2001) erbrachte ähnliche Ergebnisse. Dort zeigten 36% der untersuchten exponierten Personen Ventilationseinschränkungen der Lunge gemessen anhand FEV_1/FVC (wird zum Diagnostizieren einer Obstruktion genutzt, solange die Vitalkapazität im Normbereich liegt), welche nur bei 10% der nicht exponierten Arbeiter gesehen wurden. Weitere gemessene Parameter wie die Vitalkapazität (VC) (vermindert bei restriktiven Funktionsstörungen) zeigten sich reduziert bei belasteten Personen. Bei den anderen Symptomen wie Sinusitis (27%), Atemnot (8%) und Dyspnoe (21%) beobachtete man ähnliches Verhältnis zugunsten der nicht belasteten Gruppe (11%, 4%, 5%). Die Ergebnisse dieser Studie konnten nicht mit anderen Risikofaktoren wie Alter, Übergewicht und Rauchen begründet und mussten auf die zementinduzierten Effekte zurückgeführt werden.

Auf der anderen Seite gibt es Studien, die keine höhere Prävalenz bei Aussetzung dem Zementstaub gegenüber zeigten. Norwegische Zementarbeiter wiesen nahezu identische Symptommhäufigkeiten der Atmungsorgane wie die Kontrollgruppe auf. Somit konnte die Annahme, dass Zementstäube Ventilationsstörungen verursachen oder eine Steigerung der Krankheitssymptome des Respirationstraktes bedingen würden, nicht belegt werden (Fell et al., 2003).

Auch Vestbo et al. (1990) fand keine Korrelation zwischen Erkrankungshäufigkeit und Zementexposition, die er anhand von Krankenhausaufenthalten wegen respiratorischen Krankheiten von Zementfabrikarbeitern und Kohlefabrikarbeitern in Dänemark untersuchte. Ähnliche Ergebnisse erbrachte seine Fall-Kontroll-Studie zur Morbidität (Erkrankungshäufigkeit) von Karzinomen. Dort gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Vestbo et al., 1991).

Nichtdestotrotz diskutiert man weiterhin über das Risiko nicht nur für chronische Krankheiten der Atemorgane, sondern sogar für das Auftreten maligner Erkrankungen in Assoziation mit Zementstaubbelastung, insbesondere das Risiko für Karzinome der Luftwege. So konzentrierte sich eine in Deutschland durchgeführte Studie auf das Larynxkarzinom und verglich die Risikofaktoren von 257 Patienten mit histologisch

nachgewiesenem Kehlkopfkarzinom mit 769 Personen aus der Bevölkerung. Es wurde ein Fragenkatalog erstellt, welcher Fragen zur berufsbedingten Exposition mit Schadstoffen und anderen Faktoren wie das Rauchen und Alkohol enthielt und in persönlichen Interviews erfragt wurde. Nachdem ein kompletter Arbeitslebenslauf individuell erstellt wurde, suchte man Berufe mit berufsassoziierten Schadstoffen, die potenzielle Karzinogene für Larynxkarzinome darstellten aus und sammelte noch ausführlichere Informationen mit Hilfe von berufsspezifischen Fragen. Als Ergebnis dieser Studie zeigte sich ein vom Rauchen, Alkohol und sozialem Status unabhängiges signifikant erhöhtes Risiko für Larynx-Karzinome nach Exposition mit Zementstaub. (Dietz et al., 2004)

Auf der Basis bisheriger epidemiologischer Studien beschäftigen sich in den letzten Jahren einige Arbeitsgruppen mit diesem Thema und führen in vitro Versuche durch. Die Studie von Sgambato et al. (2010) nahm sich die Überprüfung der Zytotoxizität und Genotoxizität von Zementstäuben auf Rattenfibroblasten zum Gegenstand Ihrer Arbeit. Die Fibroblastenzelllinie wurde sowohl direkt gegenüber verschiedenen Zementstäuben mit Konzentrationen von 10, 25, 50, 100 und 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, wie auch gegenüber Zementen in Suspensionen gelöst zu 0, 10, 20, 40, 60, 80 und 100% exponiert und mit Zellen im Kulturmedium verglichen. Es wurde neben den Effekten auf den Wachstum der Zellen und Zellproliferation auch DNA-schädigende Effekte beobachtet. Dabei konnte auch ein Unterschied zwischen direktem und indirektem (in Lösung gelöste Stäube) Staubkontakt herausgearbeitet werden. Jeweils zwei Konzentrationen (25 und 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ und 10 und 20%), die keine Zytotoxizität aufwiesen, wurden für weitere Versuche herangezogen. Alle Zemente im direkten Kontakt mit Zellen zeigten in der höchsten getesteten Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Hemmung des Zellwachstums, beim indirekten Kontakt zeigten alle Extrakte erhebliche Effekte auf das Zellwachstum mit Ausnahme von TX Active white-Zement. Die DNA-schädigenden Effekte wurden bei Konzentrationen von 20% für Extrakte und von 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ im direkten Kontakt getestet und anhand des Tail Moment nach 1 und 12 Stunden gemessen. Alle Proben führten zum Anstieg der DNA-Schäden, jedoch signifikant geringer als die positive Kontrolle. Interessanterweise waren jedoch die toxischen Auswirkungen der Zemente reversibel, so dass nach Entfernen der Zementstäube die Reparaturmechanismen der Zellen eingriffen und kaum Effekte mehr zu sehen waren. Insgesamt konnte diese Studie zwar die Zemente als gefährliche Stoffe ausweisen, beurteilt jedoch eher nicht die

Langzeitwirkung oder die potentielle Kanzerogenität dieser Stoffe. (Sgambato et al., 2010)

4.2.2 Überlegungen zu gentoxischen Wirkmechanismen von Zement-Staubpartikeln und Inhaltsstoffen

Nach dem Erscheinen der Rhein-Neckar-Studie wurden die Überlegungen zur Gentoxizität von Zementstaubexposition aufgegriffen. Die potentiellen Risiken von Partikeln mit ihren Eigenschaften sowie die Mechanismen der möglichen Schädigungen des oberen Respirationstraktes wurden diskutiert. Es muss zwischen mehreren Vorgängen, ausgelöst durch Beschaffenheit der Zementpartikel und weiteren damit assoziierten Eigenschaften unterschieden werden. Die Ursachen für die Induktion von schädigenden Wirkungen liegen zum einen in der Alkalität der Zementgemische zum anderen in den darin enthaltenen metallischen Ionen sowie in der direkten Einwirkung der feinen Teilchen. Außerdem sind weitere Inhaltsstoffe der Zemente wie Puzzolane und Siliziumdioxid nicht außer Acht zu lassen.

Diese Gegebenheiten erschweren zu einem großen Teil einen schlüssigen Aufbau einer Studie in der die Effekte der Zemente auf die Gesundheit des Menschen untersucht werden können. So existieren nur wenige Studien bzw. Publikationen, die einige Vorschläge zu den Wirkmechanismen machen oder sich an den Nachweis von karzinogenen Effekten von Zementen oder seinen Komponenten herantrauen. (Borm, Cemberau, 2006)

Mögliche Hypothesen wurden von Knaapen et al. aufgestellt. Es wird der Verdacht ausgesprochen, dass partikuläre Stoffe die Generation von ROS (reactive oxygen species) und RNS (reactive nitrogen species) in Gang setzten und damit die Karzinogenese des Respirationstraktes begünstigen. Dabei sollte zwischen von den Partikeln selbst induzierten Reaktionen sowie zwischen von ihnen in Gang gesetzten zellulären Vorgängen wie zum Beispiel Aktivierung von Mitochondrien oder Enzymen, die für eine Entstehung von freien Radikalen und für eine Steigerung des oxidativen Stresses verantwortlich sind, diskriminiert werden. Neben diesen primären, von den Partikeln und vor allem von den Eigenschaften ihrer Oberfläche ausgelösten Effekte, unterscheidet man die sekundären, durch eine Entzündung hervorgerufenen Auswirkung. Alle diese Wirkungsbeziehungen sind in der Lage gentoxische Effekte

auszulösen und in der Karzinogenese eine wichtige Rolle zu spielen. (Knaapen et al., 2004)

Folgende schematische Zeichnung skizziert die Mechanismen, die als Hypothese für diese Arbeit herangezogen wurde.

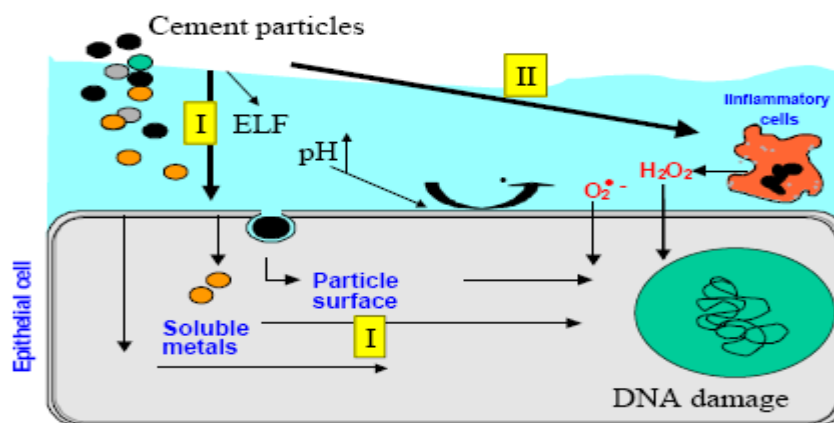


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Studienhypothese. (Borm, Cembureau, 2006) (Epithelial cell=Epithelzelle, Soluble metals=lösliche Metalle, Particle surface=Partikeloberfläche, ELF (epithel lining fluid)=Epithel umgebende Flüssigkeit, Inflammatory cells=Entzündungszellen, Cement particles=Zementpartikel)

Es ist bekannt, dass alle Zementgemische eine eigene Alkalität besitzen, damit Beton gegenüber sauren Milieus standhaft bleibt und lange Zeit seine Festigkeit behält (www.iemb.de, www.vdz-online.de). Diese Alkalität wird für die chemisch-irritative Wirkung im Zusammenhang mit Zementstaubexposition auf den oberen Respirationstrakt verantwortlich gemacht und verursacht entzündliche und obstruktive Atemstörungen (Sicherheitsdatenblatt gemäß der EU-Richtlinie 91/155/EWG).

Als erstes wird angenommen, dass auch Partikel selbst fähig sind den pH-Wert in der flüssigen Umgebung der Epithelzellen zu verändern. Zweitens liegt die Vermutung nahe, dass auch Zementpartikel sowie der veränderte pH-Wert eine Entzündungsreaktion triggern und damit zu einer DNA-Zerstörung führen könnten (s. Abbildung unter II). Ein weiterer Prozess hängt vermutlich mit der direkten Einwirkung der Partikel und Metalle auf die DNA und damit verbundenen genotoxischen Resultaten auf den menschlichen Respirationstrakt zusammen. (Borm, Cembureau, 2006) Schaltet man diesen bekannten Störfaktor, nämlich die Alkalität, was auch in dieser Studie erfolgte, aus, kann man sich auf die von Zementpartikeln direkt ausgehende Wirkung konzentrieren.

Da es bisher keine tierexperimentellen bzw. in vivo sowie keine in vitro Studien gibt, die die oben genannten Überlegungen belegen, bleiben die Wirkmechanismen der Zemente noch ungeklärt.

4.2.3 Bewertung eigener Ergebnisse

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurden Testreihen mit europäischen Portlandkompositzementen, Klinker und Kalksteinmehl, die vom Verein Deutscher Zementwerke (VDZ) Düsseldorf Anfang 2006 vorbereitet, kodiert und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt. Alle Untersuchungen mit den zu prüfenden Zementen verliefen blind. Insgesamt waren 11 Staubproben getestet worden, 5 der Zemente (Zement G, H1, K, L und M) wurden von Noak, N. mit gleichen Methoden überprüft.

Von den 6 in dieser Studie getesteten Zement-Staubproben zeigte einzig Zement A eine Zunahme der DNA-Migration. Die höchste getestete Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ präsentierte sich signifikant erhöht und wies damit bei dieser Konzentration auf eine gentoxische Wirkung auf die Epithelzellen A549 hin, jedoch im weit geringeren Ausmaß als die positive Referenz Quarz (DQ12), was auf eine deutlich geringere Gentoxizität des Zementes A im Vergleich zum Quarz hinweist.

Alle anderen Stäube schwankten bezüglich der DNA-schädigenden Wirkung im Bereich der Lösungsmittelkontrollen und zeigten kaum Dosis-Wirkungsbeziehungen.

Die Vitalität der behandelten Zellen wurde bei allen Testreihen und bei allen Proben im Erytrosin B-Assay auf $\geq 80\%$ bestimmt. Im WST-1-Assay konnte bei der höchsten Konzentration des Kalksteinmehls eine gering reduzierte Vitalität von 73% gesehen werden, ohne dass die anderen Proben diese Effekte aufwiesen. Somit können alle Zemente als nicht zytotoxisch eingestuft werden.

Verantwortlich für die toxischen Effekte der Zemente auf die Lungenepithelzellen können neben der Zementstaubgröße, auch die pH-Werte der Zemente, die chemische Zusammensetzung und die geprüften Konzentrationen sein.

Alle zu testenden Zementproben wurden mit einem Zick-Zack-Sichter separiert, um einen medianen Durchmesser der Partikelgrößen zwischen 1 bis 3 μm zu erhalten bei einem maximalen Durchmesser aller Partikel $< 10 \mu\text{m}$. Bereits bei dieser Verteilung der Partikelgrößen mit großem Anteil an inhalierbaren und bis zu Bronchiolen und Alveolen

vordringenden Teilchen mit $<2,5\ \mu\text{m}$ wären zytotoxische und gentoxische Effekte zu erwarten. Weiterhin sollte auch die kleine Fraktion der ultrafeinen Teilchen, die trotz der geringen Konzentration möglicherweise zu toxischen Effekten führen könnte, nicht außer Acht gelassen werden. Diese biologische Einflüsse sind bereits in mehreren Studien nachgewiesen (Diabaté et. al., 2004, Sydlik, 2006). Da in dieser Studie nur beim Zement A gentoxische Ereignisse gezeigt wurden und alle weiteren untersuchten Proben ohne Nachweis von Gentoxizität bei gleicher Größenverteilung der Partikel blieben, scheint die Partikelgröße für diese Experimente keine gravierende Rolle gespielt zu haben. Weitere Untersuchungen mit genauerer Auftrennung der Fraktionen könnten hierfür weiterführende Erkenntnisse bringen.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Toxizität der Zemente ist die Dosis der geprüften Stäube ($25\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $50\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $100\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $200\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$), der die Lungenzellen ausgesetzt sind. Der menschliche Respirationstrakt verfügt durch seine Anatomie über verschiedene Abwehr- und Reinigungsmechanismen gegenüber inhalierbaren Schadstoffen. Unter den nichtspezifischen Mechanismen ist die Atemwegsclearance mit Husten und Tätigkeit des Flimmerepithels (mucoziliäre Clearance) angesiedelt. Der Abtransport der inhalierten Partikel wird durch tracheobronchiale und alveoläre Sekrete (Surfactant) mit zellulären Komponenten wie Lysozyme und Komplement begünstigt. Folgend werden Teilchen im Schleim fixiert und mit Bewegung der Zilien nach oral mobilisiert. Im Larynx angelangt, findet das Abhusten oder das Verschlucken der Staubkörnchen statt.

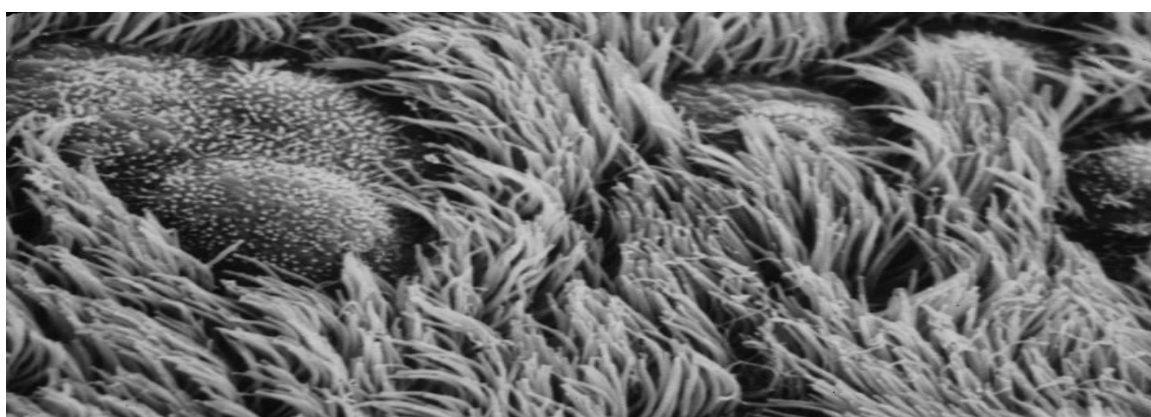


Abbildung 32: Flimmerhärchen und Schleim in den Luftwegen, Staub wird hinauf transportiert. (Quelle: Valic, E 2005)

Des Weiteren erfolgt die Elimination der korpuskulären Stoffe mit Hilfe von zellulären Schutzfunktionen. Zellen wie Makrophagen in den Alveolen oder Monozyten im Blut

phagozytieren bestimmte Teilchen, um sie dann mukoziliär, lymphogen oder hämatogen abzutransportieren. Die Dauer des Reinigungsvorgangs richtet sich nach der Konzentration der Stäube und verlängert sich mit steigender Konzentration. Wird dieser Reinigungsmechanismus überstrapaziert, kommt es zum kompletten Sistieren der Makrophagenfunktion, sodass feine und ultrafeine Partikeln Monate bis Jahre in den Atemwegen verweilen. Die Störung dieser Wirkmechanismen haben die Entwicklung von akuten und chronischen Lungenerkrankungen zur Folge, bei Quarzstäuben wird sogar eine karzinogene Wirkung in der Literatur beschrieben. (Lingappa, Physiologie Silbernagel) Im Hinblick auf die Testreihen wären bei Existenz von den o.g. Abwehrmechanismen die getesteten Konzentrationen und damit die Stärke der Belastung der Alveolarzellen physiologisch kaum zu erreichen. Dennoch sieht man das Fehlen der entsprechenden toxischen Effekte bei fast allen Zementproben, sodass der Einfluss der Partikelanzahl in dieser Experimentenreihe wahrscheinlich zu vernachlässigen ist.

Der Zement mit seinen Inhaltsstoffen muss den Ansprüchen und den Bauvorschriften als Baustoff entsprechen. Nach Zugabe von Wasser entsteht eine Suspension, die eine hohe Alkalität mit pH-Werten von bis zu 13 aufweist, um den nötigen Korrosionsschutz für den Baustahl als Bindemittel zu gewährleisten. Diese Eigenschaft ist für ihre ätzende und irritative Wirkung bekannt. In allen Versuchen mit den Zementsuspensionen wurde ein Medium (HBSS) verwendet, welches für die A549-Lungenzellen ein Milieu im physiologischen pH-Bereich um 7,40 bereitstellte. HBSS führte aufgrund seiner Puffereigenschaft dazu, dass die hohe Alkalität des Zement-Lösungsmittel-Gemisches annähernd bis zum physiologischen pH-Wert abgepuffert wurde. Damit konnten die schädigenden Auswirkungen auf die Epithelzellen, die von einem hohen pH-Wert ausgehen würden, eliminiert werden, um der Verfälschung der Messergebnisse vorzubeugen. Betrachtet man dieses aus einer anderen Sicht, erfolgt durch die Neutralisation der Staubsuspensionen eine Verzerrung der tatsächlichen Gegebenheiten in den Atemwegen. Dort werden die Staubpartikel in das zum größten Teil aus Wasser und Mucinen bestehende Sekret impaktiert ohne eine gravierende pH-Wert-Abpufferung zu erfahren. Somit ist anzunehmen, dass die toxischen Effekte der Zemente in Wirklichkeit unter physiologischen Bedingungen deutlich stärker sein müssten.

Andererseits zeigten die Experimente trotz der pH-Neutralität eine Toxizität des Zementes A. Daher müssen zum Schluss die Wichtigkeit und der wahrscheinliche

Einfluss der Inhaltsstoffe einzelner Staubproben betrachtet werden. Aus dem Analysebericht von VDZ (s.o.) ist es ersichtlich, dass neben den Schwermetallen wie z.B. Eisen, Kupfer, Blei, Zink, Zinn, Nickel, Cadmium, Chrom usw. auch Siliziumdioxid zu den chemischen Bestandteilen der Zemente gehört. Siliziumdioxid seinerseits ist der Hauptbestandteil des Quarzsandes und bildet 90% des Dörentruerquarzes, welcher in dieser Arbeit als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Betrachtet man den Inhalt des Zementes A näher, ist zu erkennen, dass Siliziumdioxid darin zu einem Anteil von >25% enthalten ist. Folgend erhält man beim Umrechnen der Maximalkonzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine Quarzkonzentration von ungefähr 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, die, wie bereits aus mehreren Studien von Schins et. al. bekannt und auch in dieser Arbeit auf die A549-Zellen gentoxisch wirkt. Dies könnte der für die Gentoxizität des Zementes A verantwortliche Faktor sein.

Ein weiterer Unterschied der Staubprobe A zu den anderen Staubproben ist der hohe Gehalt an Puzzolanen, die unter Verdacht stehen toxische Wirkung aufzuweisen. Puzzolan ist ein Gestein vulkanischen Ursprungs und enthält neben Siliziumdioxid Aluminiumoxid (Tonerde) (www.vdz-online.de, www.wikipedia.de, www.bvk-online.com). Aluminiumoxid ist ebenfalls für seine toxische Wirkung bekannt. Neben Hautreaktionen wie Kontaktdermatitis bei direktem Kontakt, kann Aluminiumstaub nach monate- bis jahrelanger Inhalation zu Lungenfibrose führen. (Dauderer-Handbuch der Umweltgifte 6/2006 unter www.toxcenter.de)

Insgesamt betrachtet, gibt es viele Inhaltsstoffe und Eigenschaften der Zemente, die einzeln oder zusammen toxische Wirkungen ausüben könnten. Dennoch zeigen die Bauzemente in dieser Studie mit geringen Einschränkungen kaum negative Effekte. Jedoch kann die Relevanz der Toxizität des Zementes A in dieser Studie nicht komplett geprüft werden. Auch die Übertragung in die Realität ist nur eingeschränkt möglich. Andererseits wird nur die Wirkung der Zemente nach 4 Stunden betrachtet und stellt somit nur eine Momentaufnahme dar. Vollzieht man jedoch die Überlegungen weiter und transferiert diese ins tägliche Geschehen am Arbeitsplatz und damit auf eine kontinuierliche Belastung des menschlichen Respirationstraktes, kann die Relevanz der möglichen gentoxischen Effekte des Zementes A sowie auch der anderen, hier nicht positiv getesteten Zemente, noch gravierender sein als vermutet.

5 Zusammenfassung

Aus mehreren epidemiologischen Studien ersichtlich, stehen die Bauzemente unter Verdacht neben akuten und chronischen Atemwegserkrankungen auch Krebserkrankungen zu verursachen. Aktuell sind jedoch kaum in vitro Studien existent, die diese Vermutungen belegen können.

In der vorliegenden Dissertation wurden Staubproben von den Zementen A, B, C, D sowie Staubproben von Klinker und Kalksteinmehl auf ihr Potential zyto- und gentoxische Effekte in A 549-Lungenepithelzellen zu induzieren, untersucht.

Die A549-Zelllinie erweist sich seit vielen Jahren als eine hervorragend geeignete Zelllinie für in vitro Toxizitätsuntersuchungen und zeigt eine mittlere Empfindlichkeit gegenüber gentoxischen Substanzen wie Quarz oder Wasserstoffperoxid. Durch die Abstammung der Zellen aus einem Lungenadenom haben diese ihre Eigenschaften und Stoffwechselvorgänge zu einem großen Teil behalten und können in ihrer Reaktionsfähigkeit auf unterschiedliche Expositionen gegenüber Testsubstanzen mit dem menschlichen Respirationstrakt verglichen werden.

Als negative Kontrolle wurde Titaniumdioxid (TiO_2), als positive Kontrolle der Dörentruer Quarz (DQ12) eingesetzt. Beide Stäube waren Gegenstand vieler in vitro Experimente, haben sich als Modellpartikel schon lange bewährt und konnten auch in dieser Arbeit ihre Verwendung rechtfertigen. Als weitere positive chemische Kontrolle fungierte Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und die Pufferlösung HBSS als Lösungsmittelkontrolle.

Die Untersuchungen erfolgten jeweils in 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit drei etablierten Testsystemen. Um die Zytotoxizität zu überprüfen wurden der Erythrosin B-Assay und der WST-1-Assay angewendet. Der Nachweis einer Gentoxizität konnte mit Hilfe des Comet-Assay erbracht werden, in dem der Schaden an der DNA anhand der DNA-Migration gemessen und im OTM-Wert ausgedrückt wurde.

Von den 6 geprüften Staubsuspensionen ließ nur Zement A in der höchsten Konzentration von $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine signifikante gentoxische Wirkung ($p = <0,05$) auf die Epithelzellen erkennen. Die Ursache für dieses toxische Potential könnte in dem Gehalt an Siliziumdioxid bzw. Quarz, welches als einer der Inhaltsstoffe in diesem Zement zu finden ist, liegen. Zement A verfügt im Vergleich zu den anderen Zementen über den

höchsten Anteil davon. Alle anderen Proben zeigten keine erhöhten DNA-Schäden. Ein zytotoxisches Potential konnte bei allen 6 geprüften Staubsuspensionen sowohl im WST-1-Assay wie auch im Erytrosin B-Assay nicht beobachtet werden.

Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit eher keine toxischen Wirkungen der untersuchten Zemente auf den Respirationstrakt vermuten (Ausnahme Zement A), dennoch sollten keine voreilige Rückschlüsse gezogen werden, denn der Ausmaß der Relevanz für die menschliche Gesundheit ist gänzlich unbekannt und bedarf weiterer Studien.

6 Summary

As seen from different epidemiological studies, the cements are suspicious of causing acute and chronic respiratory disease apart from being carcinogenic. However there are hardly in vitro studies, that support these suppositions.

It was tested in this dissertation cement A, B, C, D and dust probes Clinker and limestone to evaluate their potential toxicity in inducing gene or cell changes to A 459 alveolar cells. The A459-cellline has been proved over the years to be excellent culture for different substances for in vitro experiments and shows medial sensitivity to known genotoxins. Because these cells descent from pulmonary adenoma, they have retain their attributes and metabolic processes and their reactivity can be compare at different exposure levels with that of human cells from the respiratory tract.

As negative reference was used Titaniumdioxid, as positive control Dörentrupe quartz. Both dusts were objects of many in vitro experiments, established as model particles for a long time and justify their use in this dissertation. As another positive chemical control functioned hydrogen peroxide and the buffer solution HBSS as negative control.

The tests were made in 3 studies independently from each other with 3 established test systems. To verify the cytotoxicity was adopt the Erytrosin B-Assay and the WST-1-Assay. The information about genotoxicity could be generate with the aid of the Comet-Assay, in those was DNA-damage detect on the basis of the DNA-Migration and demonstrate in OTM.

Only cement A shows in the highest concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of 6 tested dust-suspensions significant genotoxic effects ($p = <0,05$) on epithelial cells. The cause for this toxically potential could be in the concentration of siliciumdioxid or rather quartz, those is to find in this cement as one of ingredients. Cement A contains the most fraction of this in compare to the other cements. All the other probes shows not any elevated DNA-damage. A cytotoxically potential was not seen on all 6 test stuffs in WST1-assay and in Erytrosin B-assay.

As a result this experimental study didn't shows toxically effect of cements on the respiratory tract (except cement A), nevertheless we should not draw hasty conclusions, because the relevance for humans health is completely unknown and requires further studies.

7 Literaturverzeichnis

Al-Neaimi, Y. I., Gomes, J., Lloyd, O. L. (2001):

Respiratory illnesses and ventilatory function among workers at a cement factory in a rapidly developing country.

Occup Med (Lond). 2001 Sep; 51(6): 367-373

Albrecht, C., Schins, R P. F., Höhr, D., Becker, A., Shi, T., Knaapen, A. M., Borm, P. J. A. (2004):

Inflammatory time course after quartz instillation role of tumor necrosis factor- α and particle surface

American Journal of Respiratory Cell and Molekular Biologie 31: 292-301

Becker, A., Albrecht, C., Knaapen, A. M., Schins, R. P. F., Höhr, D., Ledermann, K., Borm, P. J. A. (2006):

Induction of CYP 1A1 in rat lung cells following in vivo and in vitro exposure to quartz.

Arch Toxicol, 80: 258–268

Bermudez, E., Mangum, J. B., Asgharian, B., Wong, B. A., Reverdy, E. E., Janszen, D. B., Hext, P. M., Warheit, D. B., and Everitt, J. I. (2002):

Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles.

Toxicol. Sci. 70: 86–97.

Bermudez, E., Mangum, J. B., Wong, B. A., Asgharian, B., Hext, P. M., Warheit, D. B. and Everitt, J. I. (2004):

Pulmonary responses of mice, rats and hamsters to subchronic

inhalation of ultrafine titanium dioxide particles.

Toxicol. Sci. 77: 347–357.

Borm, P.J.A., Höhr D., Steinfartz, Y., Zeitträger, I., Albrecht, C. (2000):

Chronic inflammation and tumor formation in rats after intratracheal instillation of high doses of coal dust, titanium dioxide and quartz.

Inhalation Toxicology 12(3): 225-231

Borm, P. J. and Tran, L. (2002):

From quartz hazard to quartz risk: the coal mines revisited.

Ann. Occup. Hyg. 46: 25–32

Borm, P. J. A., Cembureau (the European Cement Association, represented by the Verein Deutscher Zementwerke e. V. (VDZ)) (2006):

Toxicological properties of cement related partikels in relation to observed malignant effects in head-neck cancers.

Study proposal

Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D. and Wang, R. (1996)

The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use Tetrazolium Salts

Biochemica 4, 14-19

Cakmak, G.D., Schins, R.P., Shi, T., Fenoglio, I., Fubini, B., Borm, P. J. (2004):

In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz.

Int J Hyg Environ Health 207 (2): 105-113

Collins, A., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kennedy, G., Setina, R. (1997)

The comet assay: what can really tell us?

Mutation research 375 (183-193)

Deutsche gesetzliche Unfallversicherung e. V.

DGUV-Statistiken für die Praxis 2011

Diabaté, S., Günther, R., Völkel, K., Thiele, D. und Wottrich, R. (2004):

Gesundheitseffekte durch inhalierbare Feinststäube aus technischen

Verbrennungsanlagen: In vitro Untersuchungen zur Wirkung feiner und

ultrafeiner Partikel auf kultivierte Lungenzellen von Forschungszentrum

Karlsruhe.

Dietz, A., Ramroth, H., Urban, T., Ahrens, W., Becher, H. (2004):

Exposure to cement dust, related occupational groups and laryngeal

cancer risk: results of a population based case-control study.

Int. J. Cancer 108: 907-911

Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., and MacNee, W. (2001).

Ultrafine particles.

Occup. Environ. Med. 58: 211–216

Fell, A. K., Thomassen, T. R., Kristensen, P., Egeland, T., Kongerud, J. (2003):

Respiratory symptoms and ventilatory function in workers exposed to

portland cement dust.

J Occup Environ Med., 45(9): 1008-1014

Floyd, R.A. (1990):

The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis.

Carcinogenesis 11:1447-1450

Fubini, B. (1998):

Surface chemistry and quartz hazard.

Ann. Occup. Hyg. 42: 521–530

Fubini, B., Hubbard, A. (2003):

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis.

Free Radic Biol Med. Jun 15;34(12):1507-16.

Hartmann, A., Speit, G. (1997):

The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay).

Toxicol Lett. 90(2-3):183-8. Abstract

Heinrich, U., Fuhst, R., Rittinghausen, S., Creutzenberg, O., Bellmann, B.,

Koch, W., and Levsen, K. (1995) in Wahrheit et al., 2006:

Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide.

Inhal. Toxicol. 7, 553–556.

Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. (1998):

The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins.

Mutagenesis. Jan;13(1):89-94.

HSE (Health and safety executive)

Portland Cement Dust

Hazard assessment document

International Agency for Research on Cancer (IARC):

Titanium dioxide (IARC Group 2B),

Summary of data reported, Feb. 2006

Jimenez, L. A., Drost, E. M., Gilmour, P. S., Rahman, I., Antoniicelli, F., Ritchie, H., MacNee, W. and Donaldson, K. (2002):

PM10-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF- α .

Am. J. Physiol. Lung

Karlson, H. L. (2010):

The comet assay in nanotoxicology research

Anal Bioanal Chem 398: 651-666

Kasai, H., Nishimura, S. (1991):

Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In oxidative stress, oxidant and antioxidants,

ed Sies H., London: Academic Press 99-116

Knaapen, Ad M., Albrecht, C., Becker, A., Höhr, D., Winzer, A., Haenen, G. R., Borm, P. J. A., Schins, R. P. F. (2002):

DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation

Carcinogenesis, Vo. 23, N. 7, 1111-1120

Knaapen, Ad M., Borm P. J., Albrecht, C., Schins, R. P. F.(2004):

Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms.

Int J Cancer. 109(6):799-809.

Lee, K. P., Trochimowicz, H. J., and Reinhardt, C. F. (1985) in Wahrheit et al., 2006:

Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 79, 179–192.

Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G. (1976):

A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.

Int. J. Cancer 17: 62-70

Lingappa / Farey :

Schutz- und Abwehrfunktionen der Lunge

Physiological Medicine

<http://user.meduni-graz.at/helmut.hinghofer-szalkay/Lungenabwehr.htm>

Mengesha, Y. A., Bekele, A. (1998):

Relative chronic effects of different occupational dusts on respiratory indices and health of workers in three Ethiopian factories.

Am J Ind Med., 34(4): 373-380.

Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. (2005).

Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles.

Environ. Health Perspect. 113: 823-839.

Olive, P. L., Banáth, J.P. and Durand, R. E. (1990):

Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet assay”.

Radiat. Res., 122: 86-94

Roche Applied Science

Cell Proliferation Reagent WST-1

Version July 2005

Shi, X., Castranova, V., B., Halliwell, B. and Vallyathan, V. (1998):

Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis.

J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. 1:181–197

Schins, R. P .F., Knaapen, A. M., Cakmak, G. D., Shi, T., Weishaupt, Ch., Borm, P. J. A. (2002):

Oxidant-induces DNA damage by quartz in alveolar cells

Mutation Research 517: 77-86

Sgambato, A., Iavocoli, I., Gorracci, M., Corbi, M., Boninsegna, A., Pietroiusti, A., Cittadini, A. and Bergamaschi, A. (2010):

Evaluation of in vitro toxic effects of cement dusts: A preliminary study

Toxicol Ind Health 2010 26: 309

Sicherheitsdatenblatt gemäß EU-Richtlinie 91/155/EWG

Storer, R. D., McKelvey, T. W., Kraynak, A. R., Elia, M. C., Barnum, J. E., Harmon, L.S., Nichols, W. W. and DeLuca, J. G. (1996):

Revalidation of the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds.

Mutat Res. 368(2):59-101 abstract

Sydlik, U. (2006):

Analyse der molekularen Mechanismen pathogener Effekte von ultrafeinen Partikeln: Induktion von Apoptose und Proliferation
Inaugural-Dissertation, Düsseldorf

Tice, R. R., Strauss, G. H. (1995):

The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation- induced DNA damage in humans.

Stem Cells 13: 207-214

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000):

Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.

Environ Mol Mutagen.35(3):206-21.

Valic, E. (2005):

Wirkungsmechanismen der Stäube im menschlichen Körper

Internationales Symposium, 9.3. - 10.3.2005 St.Gallen

Vestbo, J., Rasmussen, F. V. (1990):

Long-term exposure to cement dust and later hospitalization due to respiratory disease.

Int Arch Occup Environ Health. 1990;62(3): 217-220

Vestbo, J., Knudsen, K. M., Raffn, E., Korsgaard, B., Rasmussen, F. V. (1991):

Exposure to cement dust at a Portland cement factory and the risk of cancer.

Br J Ind Med. 1991 Dec;48(12): 803-807

Warheit, D.B., Webb, T.R., Sayes, C.M., Colvin, V.L. and Reed, K. L. (2006):

Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area.

Toxicological Sciences, 91(1): 227-236.

Warheit, D. B., Webb, T. R., Colvin, V. L., Reed, K. L. and Sayes, C. M. (2006):

Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics.

Toxicological Sciences, 95(1): 270-280.

Warheit, D. B., Webb, T. R. and Reed, K. L. (2006):

Pulmonary toxicity screening studies in male rats with TiO₂ particulate substantially encapsulated with pyrogenically deposited, amorphous silica.

Part Fibre Toxicol. 3: 3

Wojewodzka, M., Grądzka, I., Buraczewska, I. (2001):

Modified neutral comet assay for human lymphocytes.

Nukleonika 2002; 47(1): 1-5

1. <http://www.cdc.gov/eLCOSH/docs/d0500/d000513/d000513.html> (Aufruf der Seite 05/2009)
2. <http://www.elcosh.org/en/document/528/d000513/cement-hazards-and-controls-health-risks-and-precautions-in-using-portland-cement.html> (Aufruf der Seite 12.11.11)
3. <http://www.vdz-online.de/415.html>
4. [http://www.iemb.de/veroeffentlichungen/schriftenreihen/sanierungsgrundlagen/Pr %FCfv/pruefv48.htm](http://www.iemb.de/veroeffentlichungen/schriftenreihen/sanierungsgrundlagen/Pr%FCfv/pruefv48.htm) (Aufruf der Seite 06/2009)
5. http://www.tumorzentrum-son.de/leitlinien/documents/TZSON-Leitlinien_Kopf-Hals-Tumoren.pdf (Aufruf der Seite 06/2009)
6. <http://www.huss-umwelt.com/de/infocenter/medizinische-bedeutung.php> (Aufruf der Seite 06/2009)
7. <http://www.cometassayindia.org/definitions.htm>
8. <http://idw-online.de/pages/de/news158422> (Aufruf der Seite 05/2009)
9. www.sigmaaldrich.com/life-science/cells-and-cell-based-assays/compozr-cytoskeletal-marker-cells.html (Aufruf der Seite 05/2009)
10. www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cancer-research/learning-center/cancer-research-protocols/comet-assay.htm (Aufruf der Seite 11/2011)

11. <http://www.osha.gov/Publications/OSHA-3351-portland-cement.pdf> (Aufruf der Seite 12.11.11)
12. <http://www.vdz-online.de/fileadmin/gruppen/vdz/3LiteraturRecherche/Zementmerkblaetter/B1.pdf> (Aufruf der Seite 18.12.12)
13. http://www.bvk-online.com/bvk_smartm/docs/Puzzolanitaet.pdf (Aufruf der Seite 18.12.12)
14. <http://www.toxcenter.de/stoff-infos/a/aluminium.pdf> (Aufruf der Seite 18.12.12)
15. <http://www.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/75974/> (Aufruf der Seite 18.12.12)

8 Anhang

Rohdaten der Experimente

DQ12

	OTM 1	OTM 2	OTM 3	Mittelwert	STABW	TTEST	Viability in %
HBSS	0,518	0,741	0,873	0,71	0,160		95
DQ12 25 µg/cm ²	1,085	1,034	1,478	1,20	0,217	0,054	87
DQ12 50 µg/cm ²	1,552	1,367	1,499	1,47	0,085	0,007	79
DQ12 100 µg/cm ²	2,273	3,185	2,26	2,57	0,475	0,018	73
DQ12 200 µg/cm ²	toxisch	toxisch	toxisch				59
H ₂ O ₂ 50 µg/l	2,191	1,733	2,954	2,29	0,55	0,038	78

Tabelle 3: OTM nach Exposition von A 549 gegenüber 25-200 µg/cm² Quarz-Suspension (4 h).

Mittelwert, Standardabweichung (STABW), TTEST.

H₂O₂

	OTM 1	OTM 2	OTM 3	Mittelwert	STABW	TTEST	Viability in %
HBSS	0,518	0,741	0,873	0,71	0,16		95
H ₂ O ₂ 25 µg/L	1,325	1,34	1,978	1,55	0,33	0,042	86
H ₂ O ₂ 50 µg/L	2,191	1,733	2,954	2,29	0,55	0,038	78
H ₂ O ₂ 100 µg/L	3,422	5,028	5,027	4,49	0,83	0,017	73

Tabelle 4: OTM nach Exposition von A549 gegenüber 25-100 µg/l H₂O₂ (4 h).

Mittelwert, Standardabweichung (STABW), TTEST.

TiO₂

	OTM 1	OTM 2	OTM 3	Mittelwert	STABW	TTEST	Viability in %
HBSS	0,518	0,741	0,873	0,71	0,16		95
TiO ₂ 25 µg/cm ²	0,311	0,338	0,326	0,33	0,012	0,057	93
TiO ₂ 50 µg/cm ²	0,328	0,279	0,339	0,32	0,029	0,051	95
TiO ₂ 100 µg/cm ²	0,402	0,622	0,429	0,48	0,107	0,183	94
TiO ₂ 200 µg/cm ²	0,82	0,94	0,82	0,86	0,062	0,132	92
H ₂ O ₂ 50 µg/L	2,191	1,733	2,954	2,29	0,55	0,038	78

Tabelle 5: OTM nach Exposition von A 549 gegenüber 25-200 µg/cm² Titaniumdioxid-Suspension (4 h).

Mittelwert, Standardabweichung (STABW), TTEST.

Zement A

	OTM 1	OTM 2	OTM 3	Mittelwert	STABW	TTEST	Viability in %
HBSS	1,099	0,826	0,58	0,84	0,232		95
TiO ₂ 100 µg/cm ²	0,402	0,622	0,429	0,48	0,107	0,130	94
A 25 µg/cm ²	1,004	1,061	0,556	0,87	0,247	0,869	94
A 50 µg/cm ²	1,031	1,024	0,818	0,96	0,108	0,514	88
A 100 µg/cm ²	1,534	1,349	1,088	1,32	0,200	0,070	81
A 200 µg/cm ²	1,581	1,724	1,259	1,52	0,213	0,028	80
DQ12100 µg/cm ²	2,273	3,185	2,26	2,57	0,475	0,015	73
H ₂ O ₂ 50 µg/L	2,191	1,733	2,954	2,29	0,55	0,039	78

Tabelle 6: OTM nach Exposition von A 549 gegenüber 25-200 µg/cm² Zement A -Suspension (4 h).

Mittelwert, Standardabweichung (STABW), TTEST.

Zement B

	OTM 1	OTM 2	OTM 3	Mittelwert	STABW	TTEST	Viability in %
HBSS	1,099	0,826	0,58	0,84	0,232		95
TiO ₂ 100 µg/cm ² *	0,402	0,623	0,429	0,48	0,107	0,13	94
B 25 µg/cm ²	0,666	0,596	0,625	0,63	0,032	0,303	90
B 50 µg/cm ²	0,955	0,621	0,499	0,69	0,211	0,519	90
B 100 µg/cm ²	1,222	0,584	0,544	0,78	0,340	0,857	84
B 200 µg/cm ²	1,095	0,745	0,593	0,81	0,230	0,915	85
DQ12 100 µg/cm ²	2,273	3,185	2,26	2,57	0,475	0,016	73
H ₂ O ₂ 50 µg/L	2,191	1,733	2,954	2,29	0,55	0,038	78

Tabelle 7: OTM nach Exposition von A 549 gegenüber 25-200 µg/cm² Zementsuspension B (4 h).

Mittelwert, Standardabweichung (STABW), TTES.

Zement C

	OTM 1	OTM 2	OTM 3	Mittelwert	STABW	TTEST	Viability in %
HBSS	0,549	0,484	0,630	0,55	0,065		95
TiO ₂ 100 µg/cm ² *	0,402	0,622	0,429	0,48	0,107	0,444	94
C 25 µg/cm ²	0,620	0,538	0,536	0,56	0,043	0,849	94
C 50 µg/cm ²	0,730	0,572	0,493	0,60	0,108	0,625	87
C 100 µg/cm ²	0,822	0,586	0,591	0,67	0,121	0,292	85
C 200 µg/cm ²	0,819	0,680	0,754	0,75	0,062	0,028	88
DQ12 100 µg/cm ²	2,273	3,185	2,26	2,57	0,475	0,021	73
H ₂ O ₂ 50 µg/L	2,191	1,733	2,954	2,29	0,55	0,038	78

Tabelle 8: OTM nach Exposition von A 549 gegenüber 25-200 µg/cm² Zementsuspension C (4 h).

Mittelwert, Standardabweichung (STABW), TTEST.

Zement D

	OTM 1	OTM 2	OTM 3	Mittelwert	STABW	TTEST	Viability in %
HBSS	0,549	0,484	0,630	0,55	0,065		95
TiO ₂ 100 µg/cm ^{2*}	0,402	0,622	0,429	0,48	0,107	0,444	94
D 25 µg/cm ²	0,633	0,593	0,669	0,63	0,034	0,203	94
D 50 µg/cm ²	0,910	0,636	0,770	0,77	0,123	0,093	87
D 100 µg/cm ²	0,722	0,668	0,697	0,70	0,024	0,065	91
D 200 µg/cm ²	0,887	0,67	0,746	0,77	0,099	0,058	94
DQ12 100 µg/cm ²	2,273	3,185	2,26	2,57	0,475	0,021	73
H ₂ O ₂ 50 µg/l	2,191	1,733	2,954	2,29	0,55	0,038	78

Tabelle 9: OTM nach Exposition von A 549 gegenüber 25-200 µg/cm² Zementsuspension D (4 h).

Mittelwert, Standardabweichung (STABW), TTEST.

Klinker

	OTM 1	OTM 2	OTM 3	Mittelwert	STABW	TTEST	Viability in %
HBSS	0,493	0,759	0,735	0,66	0,132		95
TiO ₂ 100 µg/cm ^{2*}	0,402	0,622	0,429	0,48	0,107	0,183	94
KLI 25 µg/cm ²	0,679	0,792	0,745	0,74	0,051	0,476	93
KLI 50 µg/cm ²	0,630	0,779	0,760	0,72	0,073	0,575	91
KLI 100 µg/cm ²	0,69	0,830	0,756	0,76	0,067	0,386	92
KLI 200 µg/cm ²	0,587	0,787	0,797	0,72	0,106	0,606	90
DQ12 100 µg/cm ²	2,273	3,185	2,26	2,57	0,475	0,019	73
H ₂ O ₂ 50 µg/L	2,191	1,733	2,954	2,29	0,55	0,038	78

Tabelle 10: OTM nach Exposition von A 549 gegenüber 25-200 µg/cm² Zementsuspension Klinker (4 h).

Mittelwert, Standardabweichung (STABW), TTEST.

Kalksteinmehl

	OTM 1	OTM 2	OTM 3	Mittelwert	STABW	TTEST	Viability in %
HBSS	0,491	0,759	0,735	0,66	0,132		95
TiO ₂ 100 µg/cm ^{2*}	0,402	0,622	0,429	0,48	0,107	0,183	94
KSM 25 µg/cm ²	0,585	0,742	0,715	0,68	0,075	0,863	93
KSM 50 µg/cm ²	0,577	0,765	0,736	0,69	0,090	0,785	92
KSM 100 µg/cm ²	0,722	0,904	0,829	0,82	0,082	0,209	92
KSM 200 µg/cm ²	0,92	0,829	0,782	0,84	0,063	0,155	89
DQ12 100 µg/cm ²	2,273	3,185	2,26	2,57	0,475	0,019	73
H ₂ O ₂ 50 µg/L	2,191	1,733	2,954	2,29	0,55	0,038	78

Tabelle 11: OTM nach Exposition von A 549 gegenüber 25-200 µg/cm² Suspension Kalksteinmehl (4 h).

Mittelwert, Standardabweichung (STABW), TTEST.

9 Danksagung

Für die Hilfe und Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken:

Bei Herrn Prof. Dr. med. V. Mersch-Sundermann für die Überlassung des Themas sowie für die Bereitstellung aller notwendigen Mittel zur Durchführung der Versuche am Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie, Gießen.

Bei Dr. Gminski für die Einführung in die Methodik, die Ratschläge und die umfassende Betreuung, während der Erarbeitung dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater für die stetige Motivation wie auch meinem Ehemann, meiner Mutter und der gesamten Familie für die moralische Unterstützung.



9 7 8 3 8 3 5 9 6 0 1 9 0